

# Generierung neutralisierender Antikörper gegen Botulinum Neurotoxin Serotyp A

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften  
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig  
zur Erlangung des Grades  
eines Doktors der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)  
genehmigte  
D i s s e r t a t i o n

von Sebastian Miethe  
aus Bergen/Rügen

1. Referent:	apl. Professor Dr. Michael Hust
2. Referent:	Professor Dr. Dieter Jahn
3. Referent:	Professor Dr. Ralf Gerhard
eingereicht am:	08.10.2014
mündliche Prüfung (Disputation) am:	27.01.2015

Druckjahr 2015



## **Vorveröffentlichungen der Dissertation**

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

### **Publikationen**

Miethe S., Rasetti-Escargueil C., Liu Y., Chahboun S., Pelat T., Avril A., Frenzel A., Schirrmann T., Thullier P., Sesardic D., Hust M.. (2014). Development of neutralizing scFv-Fc against botulinum neurotoxin A light chain from a macaque immune library. *MAbs* 6, 446–459.

Chahboun, S., Hust, M., Liu, Y., Pelat, T., Miethe, S., Helmsing, S., Jones ,R.G., Sesardic, D. and Thullier, P. (2011). Isolation of a nanomolar scFv inhibiting the endopeptidase activity of botulinum toxin A, by single-round panning of an immune phage-displayed library of macaque origin. *BMC-Biotechnology* 1:113



*Aegroto, dum anima est, spes est.*



---

**Inhaltsverzeichnis**

Abkürzungsverzeichnis	VI
Abbildungsverzeichnis	X
Tabellenverzeichnis	XII
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Antikörper	1
1.2 Struktur und Wirkungsmechanismus von Antikörpern	1
1.3 Rekombinante Antikörperformate	3
1.4 Antikörper-Generierung	4
1.4.1 Polyklonale Antikörper	4
1.4.2 Monoklonale Antikörper	5
1.5 Phagen Display Technologie	5
1.5.1 Bakteriophagen	6
1.5.2 Antikörper Phagen Display	6
1.5.3 Antikörpergenbibliotheken	8
1.5.4 Selektion von Antikörperphagen	8
1.6 Antikörper-Humanisierung	10
1.7 Botulismus und Botulinum Neurotoxin	12
1.7.1 Botulismus	12
1.7.2 Botulinum Neurotoxin	13
1.7.3 Struktur und Wirkungsmechanismus von Botulinum Neurotoxin	16
1.8 Zielsetzung	18
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>20</b>
2.1 Material	20
2.1.1 Verbrauchsmaterial	20
2.1.2 Säulen und Kit-Systeme	21
2.1.3 Geräte	21
2.1.4 Chemikalien, Lösungen und Puffer	22
2.1.5 Medien und Supplemente	27
2.1.6 Bakteriophagen, Mikroorganismen, Zelllinien, Organismen	28
2.1.7 Plasmide	28
2.1.8 Oligonukleotide	29
2.1.9 Enzyme und zugehörige Puffer	32
2.1.10 Kommerziell verfügbare Antikörper	32

2.1.11	Software und Datenbanken	33
2.1.12	Sonstiges	34
2.2	Mikrobiologische Methoden	34
2.2.1	Sterilisation	34
2.2.2	Lagerung von <i>E. coli</i> -Zellen	34
2.2.3	Herstellung von kompetenten <i>E. coli</i> -Zellen	34
2.2.3.1	Herstellung von chemokompetenten <i>E. coli</i> -Zellen	35
2.2.3.2	Herstellung von elektrokompenten <i>E. coli</i> -Zellen	35
2.2.4	Transformation von chemokompetenten <i>E. coli</i> -Zellen mittels Hitzeschock	35
2.2.5	Transformation von elektrokompenten <i>E. coli</i> -Zellen mittels Elektroporation	36
2.2.6	Generierung einer Immun-Antikörpergenbibliothek aus <i>Macaca fascicularis</i>	36
2.2.7	Generierung einer scFv-Phagenbibliothek	37
2.2.8	Selektion von scFv-präsentierenden Phagen aus einer Antikörpergenbibliothek ( <i>panning</i> )	37
2.2.9	Titerbestimmung von scFv-Phagen	38
2.2.10	Produktion löslicher scFv-Antikörper in Mikrotiterplatten	38
2.3	Molekularbiologische Methoden	39
2.3.1	Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels der Polymerase Ketten Reaktion	39
2.3.2	Präparation von Plasmid-DNA	40
2.3.3	Präzipitation von DNA mittels Ethanol-Fällung	40
2.3.4	Bestimmung der DNA-Konzentration mittels NanoDrop	40
2.3.5	Agarose-Gelelektrophorese	41
2.3.6	DNA-Sequenzierung	41
2.3.7	DNA-Synthese	41
2.3.8	Enzymatische Restriktion von DNA	41
2.3.9	Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten	41
2.3.10	Ligation von DNA-Fragmenten	42
2.4	Biochemische Methoden	42
2.4.1	Reinigung von IgG sowie scFv-Fc-Antikörper mittels Protein A	42
2.4.2	Konzentrationsbestimmung von IgG sowie scFv-Fc-Antikörper mittels NanoDrop	43
2.4.3	SDS-Polyarcylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	43
2.4.4	Visualisierung von Proteinen mittels Coomassie-Färbung	44
2.4.5	Western Blot	44
2.4.6	Immunfärbung	44

2.4.7	Epitop-Kartierung	45
2.4.8	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i> (ELISA)	45
2.4.9	<i>Human Capture</i> ELISA	46
2.4.10	<i>In vitro</i> Endopeptidase Assay	46
2.5	Biophysikalische Methoden	47
2.5.1	Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (SPR-Spektroskopie)	47
2.5.2	Analytische Größenausschlusschromatographie	47
2.6	Zellbiologische Methoden	47
2.6.1	Kultivierung von HEK293-6E-Zellen	47
2.6.2	Transfektion von HEK293-6E-Zellen	48
2.7	Tierversuche	48
2.7.1	Immunisierung von Versuchstieren	48
2.7.2	<i>Ex vivo Nervus phrenicus hemidiaphragma</i> Assay	48
2.7.3	<i>In vivo</i> Paralyse Assay	49
2.7.4	<i>In vivo</i> Maus Letalitäts (MLD) Assay	49
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>50</b>
3.1	Konstruktion der anti-BoNT/A1-L Antikörpergenbibliothek	50
3.2	Selektion spezifischer scFv-Antikörper gegen die leichte Kette von BoNT/A1	51
3.3	Selektion spezifischer scFv-Antikörper gegen das Holotoxin BoNT/A1	51
3.4	Sequenzanalyse der isolierten anti-BoNT/A1 scFv	52
3.5	Konvertierung der scFv-Antikörper in das scFv-Fc-Format	54
3.5.1	Klonierung, Produktion und Reinigung der anti-BoNT/A1-L scFv als scFv-Fc- Antikörper	54
3.5.2	Produktionskontrolle der anti-BoNT/A1-L scFv-Fc mittels Antigen-ELISA	55
3.6	Charakterisierung der anti-BoNT/A1-L scFv-Fc-Antikörper mittels <i>in vitro</i> und <i>ex vivo</i> Assays	56
3.6.1	<i>In vitro</i> Endopeptidase Immunassay	56
3.6.2	<i>Ex vivo Nervus phrenicus hemidiaphragma</i> Assay	58
3.7	Charakterisierung der neutralisierenden sowie inhibitorischen scFv-Fc-Antikörper gegen BoNT/A1	60
3.7.1	Affinitätsbestimmung mittels Oberflchenplasmonenresonanzspektroskopie	60
3.7.2	Epitope-Charakterisierung der neutralisierenden sowie inhibitorischen scFv-Fc-Antikörper gegen BoNT/A1	61
3.7.3	Epitop-Kartierung von SEM95-C6	62

3.7.4	Kreuzreaktivität von SEM95-C6 und SEM95-G8 mit Botulinum Neurotoxin Serotyp B und Serotyp E	64
3.7.5	<i>Ex vivo Nervus phrenicus hemidiaphragma</i> Assay von SEM95-C6 und SEM95-G8	65
3.8	Selektion von kreuzreaktiven scFv-Antikörper gegen die leichte Kette von Botulinum Neurotoxin Serotyp A/B/E mittels HAL9/10 und Immunbibliotheken	66
3.8.1	Sequenzanalyse der aus HAL9/10 selektierten scFv	68
3.8.2	Klonierung, Produktion und Reinigung aus der HAL9/10 selektierten scFv als scFv-Fc-Antikörper	68
3.8.3	Charakterisierung der aus HAL9/10 selektierten Antikörper	69
3.8.4	<i>Ex vivo Nervus phrenicus hemidiaphragma</i> Assay mit SEM253.7-C6	70
3.9	Humanisierung der BoNT/A1 neutralisierender Antikörper	71
3.9.1	Bestimmung der humanen Keimbahnliniengene mit der höchsten Homologie zu SEM120-IIIC1	72
3.9.2	Strukturmodellierung der humanisierten Varianten von SEM120-IIIC1	73
3.9.3	Klonierung, Produktion und Reinigung der humanisierten Varianten von SEM120-IIIC1 als scFv-Fc-Antikörper	75
3.9.4	Charakterisierung der humanisierten Varianten von SEM120-IIIC1	76
3.9.5	Biochemische Analyse der humanisierten VH-Varianten Hu <sub>1</sub> VH/V21>L und Hu <sub>2</sub> VH/V21>L	78
3.9.6	Klonierung, Produktion und Reinigung der humanisierten SEM120-IIIC1 Varianten als humanen IgG	79
3.9.7	Bestimmung des Aggregationsverhaltens der humanisierten SEM120-IIIC1 Varianten mittels Größenausschlusschromatographie	80
3.9.8	<i>Ex vivo Nervus phrenicus hemidiaphragma</i> Assay mit den humanisierten Varianten von SEM120-IIIC1 als IgG	81
3.10	<i>In vivo</i> Paralyse Assay mit hu8SEM120-IIIC1	82
3.11	<i>In vivo</i> Maus Letalität (MLD) Assay mit hu8SEM120-IIIC1 und hu8A1Hc38	84
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>86</b>
4.1	Generierung spezifischer Antikörper gegen die leichte Kette von BoNT/A1	87
4.2	Antikörper-vermittelte Inhibition der Endopeptidase Aktivität sowie Neutralisation der Toxizität von BoNT/A1	90
4.3	Charakterisierung der Endopeptidase Aktivität inhibierenden sowie neutralisierenden Antikörper	92
4.4	Selektion kreuzreaktiver Antikörper	93



4.5	Humanisierung des anti-BoNT/A1 spezifischen Antikörpers SEM120-IIIC1	95
4.6	Protektivität der anti-BoNT/A1 IgG im <i>in vivo</i> Paralyse Assay sowie im <i>in vivo</i> Maus Letalitäts Assay	99
4.7	Ausblick	99
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>101</b>
<b>6</b>	<b>Summary</b>	<b>103</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>104</b>
<b>Danksagung</b>		

**Abkürzungsverzeichnis**

$\alpha$	anti
A	Alanin (Ala)
AG	Arbeitsgruppe
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
AS	Aminosäure
$\beta$ ME	$\beta$ -Mercaptoethanol
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3'-Indolylphosphat p-Toluidin Salz
bp	<i>base pair</i>
BoNT	Botulinum Neurotoxin
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
C	Cystein (Cys)
ca.	circa
C <sub>H</sub>	konstante Domäne der schweren Kette
C <sub>L</sub>	konstante Domäne der leichten Kette
CDC	<i>complement dependent cytotoxicity</i>
CDR	<i>complementary determining regions</i>
cfu	<i>colony forming units</i>
C-Terminus	Carboxy-Terminus
dH <sub>2</sub> O	deionisiertes Wasser
D	Asparaginsäure (Asp)
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
E	Glutaminsäure (Glu)
EC <sub>50</sub>	50 % effektive Konzentration
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
<i>et al.</i>	<i>et alteri</i>
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
F	Phenylalanin (Phe)
f oder for	<i>forward</i>

---

Fab	<i>fragment antigen binding</i>
Fc	<i>fragment cristallizable</i>
FCS	<i>foetal calf serum</i>
FR	<i>framework region</i>
Fv	<i>fragment variable</i>
°C	Grad Celsius
G	Glycin (Gly)
g	Gramm
<i>g</i>	Schleuderziffer, Erdbeschleunigung $9,81 \text{ m}\cdot\text{s}^{-2}$
GI	<i>Germinality Index</i>
H	Histidin (His)
h	Stunde
HA	Hämagglutinin
hFc	humaner IgG1-Fc-Teil
HRP	Meerrettichperoxidase ( <i>horseradish peroxidase</i> )
I	Isoleucin (Ile)
IC <sub>50</sub>	50 % inhibitorische Konzentration
Ig(A,D,E,G,M)	Immunglobulin (A,D,E,G,M)
i.p.	intraperitoneal
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
K	Lysin (Lys)
kDa	Kilodalton
K <sub>D</sub>	Dissoziationskonstante
k <sub>off</sub>	Assoziationsrate
k <sub>on</sub>	Dissoziationsrate
L	Leucin (Leu)
L	Liter
LD <sub>50</sub>	letale Dosis (50 %)
M	Methionin (Met)
M	Molar
mA	Milliampere
mFc	muriner IgG2c-Fc-Teil
mg	Milligramm
min	Minute
mL	Milliliter

## Abkürzungsverzeichnis

---

MLD <sub>50</sub>	Maus letale Dosis (50 %)
mM	Millimolar
µg	Mikrogramm
µL	Mikroliter
µM	Mikromolar
MTP	Mikrotiterplatte
N	Asparagin (Asn)
NAP	Neurotoxin-assoziiertes Protein
n.b.	nicht bestimmt
NBT	Nitro-Blue Tetrazolium Chlorid
nm	Nanometer
N-Terminus	Amino-Terminus
NTNH	nicht-toxische Komponente ohne Hämagglutinin
OD <sub>600</sub>	optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm
ORI	<i>origin of replication</i>
P	Prolin (Pro)
PA	Polyacrylamid
<i>p.a.</i>	<i>pro analysi</i>
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PBS-T	Tween 20 in PBS
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
pelB	Signalpeptidsequenz zum Transport des Proteins in das Periplasma
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Q	Glutamin (Gln)
R	Arginin (Arg)
r oder rev	<i>reverse</i>
RBS	ribosomale Bindungsstelle
rpm	Umdrehungen pro Minute ( <i>rotations per minute</i> )
RT	Raumtemperatur
RNase	Ribonuklease
RU	Resonanzeinheit
S	Serin (Ser)
s	Sekunde
scFv	<i>single chain fragment variable</i>

---

scFab	<i>single chain fragment antigen binding</i>
scFv-Fc	<i>single chain Fragment variable Fragment crystallisable fusion</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat ( <i>sodiumdodecylsulfate</i> )
SDS-PAGE	Denaturierende SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese
SNAP-25	<i>synaptosomal-associated protein of 25 kDa</i>
SNARE	<i>soluble N-ethyl-maleimide-sensitive factor attachment protein receptor</i>
T	Threonin (Thr)
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TMB	Tetramethylbenzidin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan
ÜN	über Nacht
ÜNK	Übernachtkultur
V	Valin (Val)
V	Volt
VAMP	<i>vesicle-associated membran protein</i>
VH oder V <sub>H</sub>	variable Domäne der schweren Kette
VL oder V <sub>L</sub>	variable Domäne der leichten Kette
(v/v)	Volumen pro Volumen
W	Tryptophan (Trp)
(w/v)	Gewicht pro Volumen
Y	Tyrosin (Tyr)

## Abbildungsverzeichnis

### Einleitung

Abbildung 1.1:	Darstellung eines Immunglobulins (IgG)	2
Abbildung 1.2:	Schematische Darstellung einiger Antikörperformate	4
Abbildung 1.3:	Schematische Darstellung eines Bakteriophagen mit zugehörigem Phagemid	7
Abbildung 1.4:	Schematische Darstellung der Selektion von scFv-Antikörper mittels Phagen Display	9
Abbildung 1.5:	Schematische Darstellung der Humanisierung eines nicht-humanen Antikörpers mittels Chimärisierung und CDR- <i>grafting</i>	11
Abbildung 1.6:	Schematische Darstellung der Humanisierung von Antikörpern mittels <i>chain shuffling</i> und <i>Germlinization</i>	12
Abbildung 1.7:	Phylogenetische Analyse von BoNT Serotypen und einiger zugehörigen Subtypen	15
Abbildung 1.8:	Struktur von Botulinum Neurotoxine	17
Abbildung 1.9:	Wirkungsmechanismus von Botulinum Neurotoxin	18

### Ergebnisse

Abbildung 3.1:	Schematische Darstellung der Immunisierung	50
Abbildung 3.2:	Antigen-ELISA zur Identifizierung BoNT/A1-L spezifischer scFv-Antikörper	51
Abbildung 3.3:	<i>Germinality Index</i> (GI) Verteilung von humanen und Makaken variablen Domänen	54
Abbildung 3.4:	SDS-PAGE der produzierten scFv-Fc-Antikörper	55
Abbildung 3.5:	Antigen-ELISA der BoNT/A1-L spezifischen scFv-Fc-Antikörper	56
Abbildung 3.6:	<i>In vitro</i> Endopeptidase Inhibition von BoNT/A1	57
Abbildung 3.7:	<i>Ex vivo Nervus phrenicus hemidiaphragma</i> Assay	59
Abbildung 3.8:	Epitop-Charakterisierung der Endopeptidase Aktivität von BoNT/A1 inhibierenden Antikörper	62
Abbildung 3.9:	Epitop-Kartierung von SEM95-C6	63
Abbildung 3.10:	Struktur von Botulinum Neurotoxin (pdb Struktur 3BTA)	63
Abbildung 3.11:	Epitop-Validierung von SEM95-C6	64
Abbildung 3.12:	Titration-ELISA von SEM95-C6 und SEM95-G8 auf Botulinum Neurotoxin Serotyp A/B und E	65

Abbildung 3.13:	<i>Ex vivo Nervus phrenicus hemidiaphragma</i> Assay	66
Abbildung 3.14:	Polyklonaler Phagen-ELISA	67
Abbildung 3.15:	SDS-PAGE mit den aus HAL9/10 selektierten Antikörper	69
Abbildung 3.16:	Charakterisierung der aus HAL9/10 selektierten Antikörper als scFv-Fc-Antikörper	70
Abbildung 3.17:	<i>Ex vivo Nervus phrenicus hemidiaphragma</i> Assay mit SEM253.7-C6	71
Abbildung 3.18:	<i>Ex vivo Nervus phrenicus hemidiaphragma</i> Assay von SEM120-IID5 und SEM120-IIIC1 als scFv-Fc und IgG	71
Abbildung 3.19:	3 D Strukturanalyse der humanisierten VH-Varianten von SEM120-IIIC1	75
Abbildung 3.20:	3 D Strukturanalyse der humanisierten VL-Varianten von SEM120-IIIC1	75
Abbildung 3.21:	SDS-PAGE der produzierten humanisierten Varianten von SEM120-IIIC1 als scFv-Fc-Antikörper	76
Abbildung 3.22:	Antigen-ELISA der humanisierten Varianten von SEM120-IIIC1	77
Abbildung 3.23:	Optimierung der humanisierten VH-Varianten Hu <sub>1</sub> VH/V21>L und Hu <sub>2</sub> VH/V21>L	79
Abbildung 3.24:	SDS-PAGE der humanisierten Varianten von SEM120-IIIC1 als IgG	80
Abbildung 3.25:	Bestimmung des Aggregationsverhaltens der humanisierten SEM120-IIIC1-Varianten mittels Größenausschlusschromatographie	81
Abbildung 3.26:	<i>Ex vivo Nervus phrenicus hemidiaphragma</i> Assay mit den humanisierten Varianten von SEM120-IIIC1 als IgG	82
Abbildung 3.27:	Schematische Darstellung der abdominale Ptosis von BALB/c Mäusen	83
Abbildung 3.28:	<i>In vivo</i> Paralyse Assay	84

## Tabellenverzeichnis

### Einleitung

Tabelle 1.1:	Phenotypische Unterteilung von <i>Clostridium botulinum</i> Stämmen	14
--------------	---	----

### Material und Methoden

Tabelle 2.1:	Verwendetes Verbrauchsmaterial	20
Tabelle 2.2:	Verwendete kommerzielle Säulen und Kit-Systeme	21
Tabelle 2.3:	Verwendete Geräte	21
Tabelle 2.4:	Verwendete Chemikalien, Lösungen und Puffer	23
Tabelle 2.5:	Verwendete Medien und Supplemente	27
Tabelle 2.6:	Verwendete Bakteriophage, Mikroorganismen, Mammaliazelllinien und Organismen	28
Tabelle 2.7:	Verwendete Plasmide	28
Tabelle 2.8:	Verwendete Oligonukleotide	29
Tabelle 2.9:	Verwendete Enzyme und zugehörige Puffer/Supplemente	32
Tabelle 2.10:	Verwendete kommerziell verfügbare Antikörper	32
Tabelle 2.11:	Verwendete Software und Datenbanken	33
Tabelle 2.12:	Zusätzliche Materialien	34
Tabelle 2.13:	Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes für die Phusion-beziehungsweise GoTaq-Polymerase	39
Tabelle 2.14:	PCR-Programm für die Amplifikation von DNA-Sequenzen	40
Tabelle 2.15:	Zusammensetzung eines Ligationsansatzes	42
Tabelle 2.16:	Zusammensetzung der SDS-PAA-Gele	43

### Ergebnisse

Tabelle 3.1:	Übersicht der eluierten Phagen	52
Tabelle 3.2:	Sequenzanalysen der selektierten anti-BoNT/A1-L scFv	53
Tabelle 3.3:	<i>In vitro</i> Endopeptidase Inhibition von BoNT/A1	58
Tabelle 3.4:	<i>Ex vivo Nervus phrenicus hemidiaphragma</i> Assay	60
Tabelle 3.5:	Affinitätsbestimmung der BoNT/A1 inhibierenden scFv-Fc-Antikörper mittels SPR-Spektroskopie	61
Tabelle 3.6:	<i>Ex vivo Nervus phrenicus hemidiaphragma</i> Assay	66
Tabelle 3.7:	Übersicht der eluierten Phagen	67
Tabelle 3.8:	Sequenzanalyse der aus HAL9/10 selektierten scFv	68



Tabelle 3.9:	<i>Ex vivo Nervus phrenicus hemidiaphragma</i> Assay von SEM120-IID5 und SEM120-IIIC1 als scFv-Fc und IgG	72
Tabelle 3.10:	Vergleich der humanen Keimbahnliniengene und SEM120-IIIC1	73
Tabelle 3.11:	Humanisierte Varianten von SEM120-IIIC1	74
Tabelle 3.12:	SPR-Spektroskopie der humanisierten Varianten von SEM120-IIIC1	78
Tabelle 3.13:	<i>Ex vivo Nervus phrenicus hemidiaphragma</i> Assay mit den humanisierten Varianten von SEM120-IIIC1 als IgG	82
Tabelle 3.14:	<i>In vivo</i> Maus Letalitäts (MLD) Assay mit hu8SEM120-IIIC1 und hu8A1Hc38	85

### 1 Einleitung

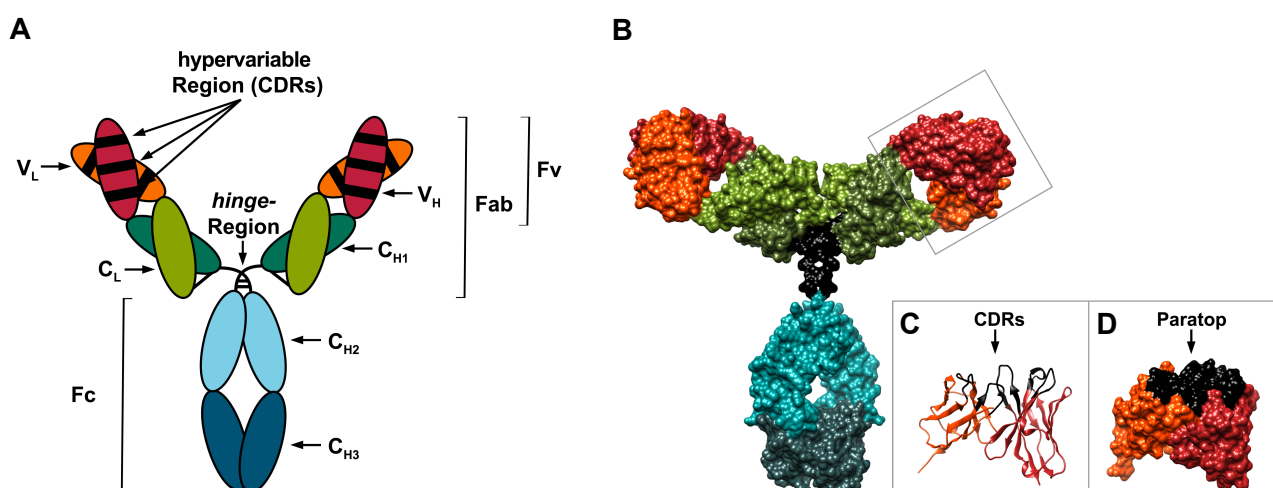
#### 1.1 Antikörper

Antikörper, auch Immunglobuline (Ig) genannt, sind ein wesentlicher Bestandteil der humoralen, adaptiven Immunantwort in höheren Vertebraten (Murphy, 2011). Ende des 19. Jahrhunderts entdeckten Emil von Behring und Shibasaburo Kitasato eine anti-toxische Aktivität des Blutserums immunisierter Tiere gegen Diphtherie- beziehungsweise Tetanustoxin, welche beim Menschen zu einem Schutz gegen Diphtherie oder Tetanus führte (Behring & Kitasato, 1890). Die daraus resultierende Serumtherapie ermöglichte erstmals die gezielte Behandlung von Infektionskrankheiten. Behrings Beitrag zur Serumtherapie und im Besonderen der Bekämpfung von Diphtherie wurde 1901 mit dem ersten Nobelpreis für Medizin ausgezeichnet. Allerdings war zu diesem Zeitpunkt der exakte Wirkungsmechanismus noch nicht entschlüsselt. Einen ersten Ansatz lieferte 1897 Paul Ehrlich mit seiner Seitenkettentheorie, die davon ausging, dass sogenannte Seitenketten im Blut auftretende Toxine spezifisch neutralisieren (Ehrlich, 1908). Astrid Fagraeus publizierte 1948 die Bildung von Antikörpern infolge einer Immunantwort von Plasmazellen (Fagraeus, 1948) und die exakte Polypeptidstruktur von Immunglobulinen wurde erst 1959 durch Rodney R. Porter und Gerald M. Edelman aufgeklärt (Edelman, 1991; Porter, 1991). Seit Entdeckung der Antikörper im frühen 20. Jahrhundert hat deren Bedeutung für die Forschung, Diagnostik und Therapie stetig zugenommen und eine Vielzahl Antikörper-basierender Präparate steht für diverse Anwendungen zur Verfügung.

#### 1.2 Struktur und Wirkungsmechanismus von Antikörpern

Die Struktur von Immunglobulinen wird durch unterschiedlich große Polypeptidketten charakterisiert, welche über kovalente und nicht-kovalente Bindungen untereinander stabilisiert werden. Hierbei wird in leichte (L, *light chain*) und schwere Kette (H, *heavy chain*) eines Immunglobulins unterschieden, welche jeweils über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind und wiederum in funktionale Domänen unterteilt werden. Die N-terminalen Domäne beider Immunglobulinketten ist durch eine hohe Variabilität gekennzeichnet und wird als *variable Region* ( $V_H$  und  $V_L$ ) bezeichnet. Die variablen Regionen beider Ketten bildet zusammen das *Fragment variable* (Fv), welches für die Antigenbindung des Immunglobulins zuständig ist. Innerhalb der variablen Domäne befinden sich drei hypervariablen Regionen (*complementarity determining regions*, CDRs), welche durch *framework* Regionen flankiert sind. Die  $\beta$ -Faltblattstruktur der *framework* Regionen bildet eine fassartige Struktur aus, welche zur Stabilisierung der CDRs

beiträgt. Die CDRs der variablen Domänen bilden zusammen die Antigenbindungsstelle (Paratop), welche eine komplementäre Struktur (Epitop) des Antigens binden (Sela-Culang *et al.*, 2013). Der variablen Domäne folgen jeweils die konstanten Domänen der leichten Kette ( $C_L$ ) und der schweren Kette ( $C_{H1}$ ), welche über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind und zusammen mit den variablen Domänen das *Fragment antigen binding* (Fab) bilden (Edelman, 1991; Porter, 1991) (Abbildung 1.1). Die genetische Information der leichten Kette befindet sich an zwei unterschiedlichen chromosomalen Loci, wodurch eine Einteilung der leichten Kette in eine lambda ( $\lambda$ )- und kappa ( $\kappa$ )- Kette erfolgt. Diese unterscheiden sich jedoch nicht hinsichtlich ihrer Funktion und liegen beim Menschen im Verhältnis 2:1 vor (Murphy, 2011). Das Fab ist über die *hinge*-Region flexibel mit dem *Fragment crystallizable* (Fc) verbunden, welches aus der  $C_{H2}$  und  $C_{H3}$  (IgA, IgD und IgG) bestehen. Hingegen besitzen IgE und IgM Antikörper, welche über eine zusätzlichen  $C_{H4}$  Domäne verfügen, keine *hinge*-Region. Über Disulfidbrücken in der *hinge*-Region und zusätzlichen hydrophoben Wechselwirkungen kommt es zur Interaktion zweier schwerer Ketten mit ihrer jeweiligen leichten Kette (Edelman, 1991; Porter, 1991).



**Abbildung 1.1: Darstellung eines Immunglobulins (IgG).** **A)** Schematische Darstellung eines IgG-Antikörpers bestehend aus zwei identischen schweren und leichten Ketten. Beiden schweren Ketten sind über 2 Disulfidbrücken miteinander kovalent verbunden und bestehen aus jeweils 3 konstanten Domänen ( $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$ ,  $C_{H3}$ ) sowie einer variablen Domäne ( $V_H$ ).  $C_{H2}$  und  $C_{H3}$  bilden zusammen den *Fragment crystallizable* (Fc). Die beiden leichten Ketten bestehen aus einer konstanten Domäne  $C_L$  und einer variablen Domäne  $V_L$ . Beiden variablen Domänen der leichten und schweren Kette gebildet zusammen das *Fragment variable* (Fv) mit den hypervariablen Regionen (*complementarity determining regions*, CDRs). Die leichte Kette ist zudem über eine Disulfidbrücke mit der schweren Kette ( $C_{H1}$  und  $V_H$ ) verbundenen und bilden zusammen das *Fragment antigen binding* (Fab). **B)** 3D Struktur eines IgG-Antikörpers (RCSB Protein Data Bank, 2ig2 und 1fc2). **C)** 3D Struktur eines *Fragment variables* bestehend aus  $V_H$  (rot) und  $V_L$  (orange) und den jeweiligen CDRs (schwarz). **D)** 3D Oberflächenstruktur eines *Fragment variables* samt Paratop (schwarz).

Aufgrund struktureller und funktionaler Unterschiede, der im Menschen vorkommenden Immunglobuline, lassen sich diese in 5 Isotypen einordnen. Hierbei handelt es sich um die schon

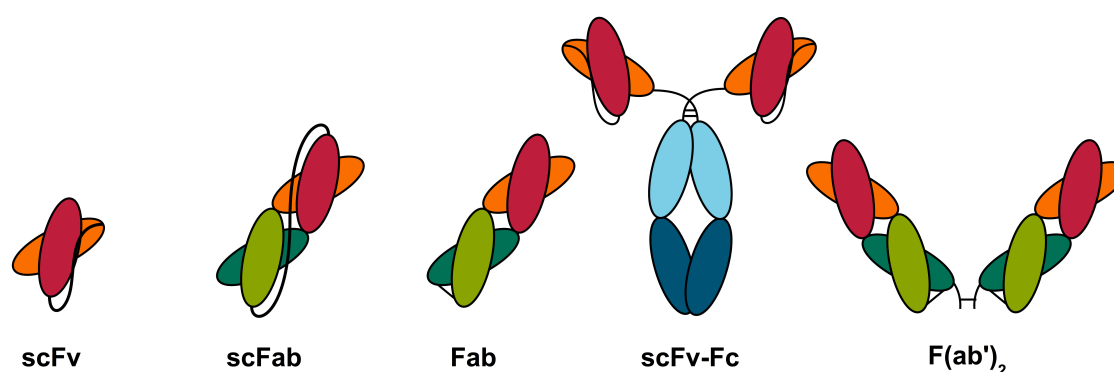
erwähnten IgA, IgD, IgE, IgG und IgM, wobei eine weitere Unterteilung des Isotyps IgA in IgA1 und IgA2 sowie von IgG in die Subklassen IgG1, IgG2, IgG3 und IgG4 erfolgt. Die jeweiligen Subklassen weisen eine 95 %-ige Sequenzhomologie auf, jedoch bewirken Abweichungen im Fc-Teil eine unterschiedliche Vermittlung der Immunantwort. In Abhängigkeit der Subklasse binden die Fc-Domänen Bestandteile des Komplementsystems oder zelluläre Fc-Rezeptoren (FcγR). Eine Antikörper-vermittelte Aktivierung des Komplementsystems (CDC, *complement dependent cytotoxicity*) erfolgt durch die Subklassen IgG1, IgG2 und IgG3 über eine Interaktion der C<sub>H2</sub>-Domäne mit dem Komplementprotein C1q (Duncan & Winter, 1988). Die Aktivierung von Effektorzellen (ADCC, *antibody dependent cellular cytotoxicity*) erfolgt hingegen durch Bindung der C<sub>H3</sub>-Domäne an FcγRI, FcγRIIa sowie FcγRIII (Ravetch & Bolland, 2001).

Als Bestandteil der humoralen Immunantwort werden Immunglobuline von B-Lymphozyten nach einem Antigen-Stimulus gebildet. An der primären Immunantwort sind hauptsächlich IgM-Antikörper beteiligt, welche in ihrer löslichen Form als Pentamer vorliegen. Im weiteren Verlauf der Immunantwort kommt es zu einer Affinitätsreifung und gegebenenfalls zu einem Isotypenwechsel vom IgM hin zu IgG, IgA oder IgE (Murphy, 2011).

### 1.3 Rekombinante Antikörperformate

Besonders in der Diagnostik und Therapie finden diverse Antikörperformate ein breites Anwendungsspektrum, bei denen nicht immer die Effektorfunktion eines vollständigen Immunglobulins erforderlich ist. Kleinere Antikörperformate besitzen den Vorteil einer besseren Gewebepenetration, welches bei einer möglichen Tumorthherapie von Relevanz ist. Andererseits verfügen sie über eine reduzierte Serumhalbwertszeit (Stockwin & Holmes, 2003; Beckman *et al.*, 2007). Bevor Antikörper rekombinant in eukaryotischen beziehungsweise prokaryotischen Expressionssystemen produziert werden konnten, war die proteolytische Spaltung von Immunglobulinen mittels Papain oder Pepsin die einzige Möglichkeit zur Generierung von Antikörperfragmenten. Durch die Proteolyse von Immunglobulinen mittels Papain ist es möglich Fab- beziehungsweise mittels Pepsin F(ab')<sub>2</sub>-Antikörper zu generieren. Bei einem F(ab')<sub>2</sub>-Antikörper handelt es sich um zwei Fab-Antikörper, die mittels einer über zwei C-terminale Cysteine ausgeprägten Disulfidbrücke miteinander kovalent verbunden sind. Die nach der Spaltung erzeugten Antikörperformate verfügen weiterhin über ihre spezifische Antigenbindung, jedoch aufgrund der fehlenden Fc-Domäne über keine Effektorfunktion (Janeway, 2009). Mit Einführung der rekombinanten Antikörpertechnologie war erstmals die Generierung zusätzlicher Antikörperformate wie beispielsweise scFv (*single chain fragment variable*) oder scFab (*single chain fragment antigen binding*) möglich (Abbildung 1.2). Mit einem Molekulargewicht von etwa

25-30 kDa repräsentiert ein scFv das kleinste Antikörperformat, welches die Antigenbindungseigenschaften eines Immunglobulins vollständig repräsentiert und lediglich aus der variablen Domäne der schweren und leichten Kette besteht. Zur Stabilisierung beider Domänen sind diese über einen kurzen, zu meist 15 Aminosäuren (AS) langen, Peptidlinker kovalent miteinander verknüpft (Bird *et al.*, 1988; Huston *et al.*, 1988). Eine Verkürzung des Peptidlinkers auf unter 15 AS führt zur Ausbildung von bivalenten beziehungsweise bispezifischen *diabodies*, abhängig davon ob zwei identische scFv oder zwei scFv mit unterschiedlicher Antigenspezifität miteinander verknüpft werden (Holliger & Winter, 1997). Ähnlich wie bei einem scFv lassen sich Fab-Antikörper mittels eines Peptidlinkers (30-36 AS) miteinander verbinden. Das so entstandene Format wird als scFab bezeichnet (Hust *et al.*, 2007). All diese Formate haben jedoch gemein, dass sie über keine Effektorfunktion verfügen. Durch die Verknüpfung eines scFv über die *hinge*-Region mit den konstanten Domänen C<sub>H2</sub> und C<sub>H3</sub> eines IgGs entsteht ein bivalenter scFv-Fc-Antikörper, welcher im Vergleich zu einem scFv über eine höhere Stabilität und Serumhalbwertszeit verfügt und aufgrund der Fc-Domäne IgG-ähnlichen Effektorfunktionen aufweist (Powers *et al.*, 2001). Ein weiteres Anwendungsgebiet ermöglichen Antikörper-Fusionsproteine. Hierbei werden Antikörper mit therapeutisch relevanten Enzymen oder Toxinen fusioniert. (Beck & Reichert, 2013; Knechtle, 2001; Kreitman, 2006; Melton & Sherwood, 1996).



**Abbildung 1.2: Schematische Darstellung einiger Antikörperformate.** Darstellung eines scFv-, scFab-, Fab-Antikörpers sowie eines bivalenten scFv-Fc und F(ab')<sub>2</sub>.

## 1.4 Antikörper-Generierung

### 1.4.1 Polyklonale Antikörper

Lange Zeit war die Ende des 19. Jahrhunderts etablierte Serumtherapie die einzige Methode Antikörper gegen lebensbedrohliche Infektionen zu generieren. Allerdings mussten hierfür Versuchstiere mit dem jeweiligen Pathogen beziehungsweise Toxin immunisiert werden, bevor dessen Blutserum mit einem polyklonalen Antikörpergemisch für die Therapie zur Verfügung stand.

Jedoch ist die so produzierte Menge an Antikörper limitiert und die Qualität der Antiseren variiert je nach Produktionscharge (Nelson *et al.*, 2000). Des Weiteren eignet sich diese Methode nur bedingt zur Generierung von Antikörpern gegen stark toxische Substanzen oder hoch konservierte Antigene (Nakamura *et al.*, 2002; Ritter, 2000). Aufgrund des polyklonalen Gemisches besteht weiterhin die Möglichkeit einer Kreuzreaktion mit diversen Antigenen, welches den Einsatz für diagnostische Verfahren erschwert. Weitere Komplikationen werden durch die Immunogenität nicht-humaner Antikörper hervorgerufen, welche besonders bei wiederholter Applikation zur Ausbildung einer Hypersensitivitätsreaktion führt. Dies beruht auf der Bildung von Antikörper gegen das nicht-humane Antiserum, wodurch dessen Wirksamkeit neutralisiert wird (Janeway, 2009). Eine Alternative stellen transgene Mäuse dar, welche über einen humanen Immunglobulin-Genloci verfügen. Nach der Immunisierung ermöglicht dies die Isolierung humaner Antikörper aus deren Blutserum (Green, 1999).

### 1.4.2 Monoklonale Antikörper

In den letzten Hundert Jahren haben sich polyklonale Antikörperpräparate für eine Vielzahl von therapeutischen und diagnostischen Anwendungen bewährt. Jedoch bedingt durch die Heterogenität der Antiseren und daraus resultierenden Einschränkungen, rücken monoklonale Antikörper mehr in den Focus. Georges Köhler und Cesar Milstein gelang 1975 erstmals die Generierung monoklonaler Antikörper mittels der von ihnen entwickelten Hybridomatechnik (Köhler & Milstein, 1975). Hierbei werden Antikörper-sekretierende B-Lymphozyten aus der Milz immunisierter Mäuse mit Myelomzellen fusioniert. Die so erzeugten Hybridome verfügen über die Antigenspezifität der B-Lymphozyten sowie der Immortalität und Antikörpersekretion der Myelomzellen. In einem anschließenden *screening* werden die jeweiligen Hybridome auf ihre Antigenspezifität untersucht und können für mehrere Jahre in flüssigen Stickstoff gelagert beziehungsweise für die Produktion monoklonaler Antikörper verwendet werden (Janeway, 2009). Eine weitere Methode zur Generierung von monoklonalen Antikörpern bieten Display Technologien wie etwa die Ribosomen-, Hefe-, oder auch Phagen Display Technologie (Zhao *et al.*, 2013; Boder *et al.*, 2012; Schirrmann *et al.*, 2011).

### 1.5 Phagen Display Technologie

Konventionelle *in vivo* Verfahren zur Generierung von Antikörpern mittels Hybridomatechnik oder transgenen Tieren stoßen bei hochwirksamen Toxinen, Haptenen und endogenen Proteinen an die Grenze des Möglichen. Eine Alternative liefern hierbei *in vitro* Verfahren zu denen auch die

Phagen Display Technologie zählt. Erstmals gelang es 1985 einen Teil der aus *E. coli* stammenden Endonuklease *EcoRI* N-terminal an das Phagenhüllprotein pIII von filamentösen Phagen zu fusionieren, auf dessen Oberfläche zu präsentieren und mittels Antiseren anzugereichern. (Smith, 1985). Diese Methode ermöglichte es wenige Jahre später Antikörperfragmente als pIII-Fusionsproteine auf M13 Bakteriophagen zu präsentieren und gleichzeitig dessen Antigenbindung aufrecht zu erhalten (McCafferty *et al.*, 1990).

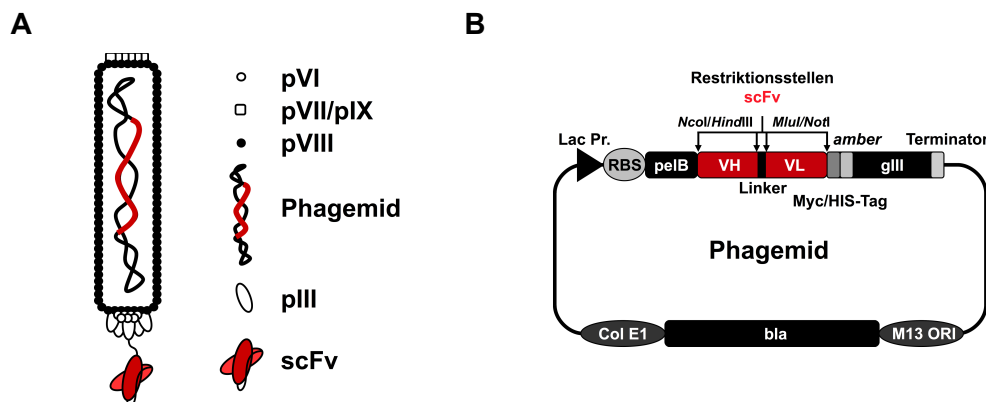
### 1.5.1 Bakteriophagen

Bakteriophagen sind wirtsspezifische Viren, welche ausschließlich Bakterien infizieren. Die *E. coli* spezifischen filamentösen Phagen M13, f1 und fd gehören zur Familie der *Inoviridae* und zählen zu den F Pilus-spezifischen Phagen (Ff) (Rakonjac *et al.*, 2011). Im Gegensatz zu lytischen Phagen töten diese nicht deren Wirtszelle, sondern führen lediglich zu einer Reduzierung der Wachstumsrate um annähernd 50 % (Barbas III, 2001). Das Virusgenom besteht aus einer einzelsträngigen, zirkulären DNA mit einer Sequenzhomologie von 98,5 % (Rakonjac *et al.*, 2011). Es beinhaltet 11 Gene, von denen drei für die Replikation, drei für den Zusammenbau des Bakteriophagen und fünf für die Hüllproteine zuständig sind. Mit etwa 2800 Kopien ist das Hüllprotein pVIII die Hauptkomponente von filamentösen Phagen und bildet eine etwa 930 nm lange und 6,5 nm breite tubuläre Struktur (Specthrie *et al.*, 1992). Weitere Hüllproteine sind mit je 5 Kopien pVII und pIX am einen sowie pIII und pVI am anderen Ende des Bakteriophagen (Barbas III, 2001).

### 1.5.2 Antikörper Phagen Display

Die Antikörperfragmente, welche bisher erfolgreich an Bakteriophagen gekoppelt wurden, reichen von den variablen Domänen bis hin zu Fab- und scFv-Antikörpern (Holt *et al.*, 2003; Hoet *et al.*, 2005; Hust *et al.*, 2007). Nicht immer wird hierbei eine Fusion mit dem pIII genutzt. Für ein heterodimeres Display werden die Hüllproteine pVII und pIX verwendet, indem die  $V_L$  Domäne an pIX und die  $V_H$  Domäne an pVII fusioniert wird (Gao *et al.*, 1999). Jedoch ist die Fusion an das pIII die am häufigsten verwendete Methode für das Antikörper Phagen Display und die Grundlage für die Generierung von Antikörpergenbibliotheken, bei denen ein Repertoire verschiedener Antikörpergene in einem für die Phagen Display Technologie geeignetem Vektorsystem vorliegt. Anfänglich wurde die genetische Information der Antikörperfragmente auf dem Phagen genom integriert. Heutige Antikörpergenbibliotheken verwenden hingegen einen speziellen Phagen Display Vektor, dem sogenannten Phagemid (Abbildung 1.3), auf dem die genetische Information

der Antikörper-pIII-Fusion in einer Expressionskassette für die Expression in *E. coli* vorliegt (Breitling *et al.*, 1991). Mittels spezieller Suppressorstämme ist es möglich, dank eines *amber stop codon* zwischen Antikörpersequenz und pIII, sowohl lösliche Antikörperfragmente als auch Antikörper-pIII-Fusionen zu produzieren (Kirsch *et al.*, 2005). Die Expression von Antikörperfragmenten in *E. coli* erfordert zudem ein für die Translokation in den periplasmatischen Raum notwendiges Signalpeptid, zumeist pelB, um im oxidativem Milieu des Periplasmas die für eine korrekte Proteinfaltung notwendigen intramolekularen Disulfidbrücken auszubilden. Des Weiteren verfügt das Phagemid über ein Resistenzgen, einem *E. coli*-Replikationsursprung und dem Verpackungssignal für den filamentösen Phagen. Für die Amplifikation der scFv-Phagen wird jedoch ein Helferphage benötigt, welcher die genetische Information für die Phagenverpackung (Phagenhüllproteine) beisteuert. Bei der Generierung neuer Phagenpartikel wird das Phagemid anstelle des Phagengenoms verpackt. Die so erzeugte direkte Kopplung von Geno- und Phänotyp ermöglicht die *in vitro* Selektion von Antikörper-präsentierenden Phagen. Die Anzahl der auf der Oberfläche präsentierten Antikörperfragmente lässt sich durch die Wahl des Helferphagen variieren. Die Verpackung mit M13 Phagen resultiert in einer monovalenten Präsentation der Antikörperfragmente auf der Oberfläche des Bakteriophagen (Chasteen *et al.*, 2006). Durch Verwendung des Hyperphagen, eine modifizierte Variante des M13 Phagen bei dem die genetische Information für das pIII deletiert wurde, lässt sich eine polyvalente Präsentation von Antikörperfragmenten erzielen (Rondot *et al.*, 2001).



**Abbildung 1.3: Schematische Darstellung eines Bakteriophagen mit zugehörigem Phagemid. A)** Darstellung eines scFv-präsentierenden M13-Phagen mit den Hüllproteinen pIII, pVIII, pVII/pIX und pVI. **B)** Struktur eines Phagemids bestehend aus: Lac Pr. (induzierbarer LacZ Promotor), RBS (ribosomale Bindungsstelle), pelB (Signalpeptid), Restriktionsstellen für die Klonierung von scFv-Gene, His/myc-Tag, *amber stop codon*, gIII (Phagenhüllprotein pIII), M13 ORI (Phagen-Verpackungssignal), bla (β-Laktamase-Resistenz), col E1 (ORI für *E. coli*).



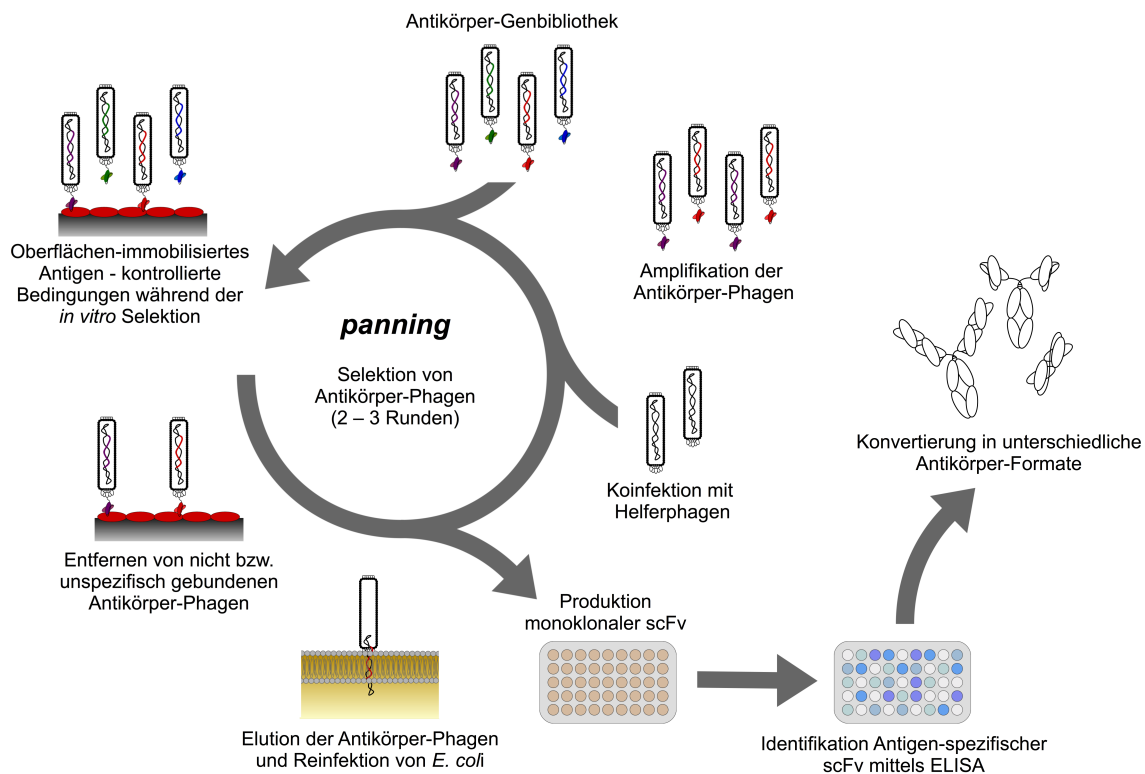
### 1.5.3 Antikörpergenbibliotheken

Abhängig vom verwendeten Spenderrepertoire wird in Immun- und universelle Antikörpergenbibliotheken unterschieden. Immunbibliotheken beinhalten die V-Gensequenzen von IgG-sekretierenden B-Lymphozyten immunisierter Spender und bieten den Vorteil einer vorherigen Affinitätsreifung. Dies ermöglicht die Selektion von Antikörpern mit einer Dissoziationskonstante im nanomolaren Bereich (Chahboun *et al.*, 2011; Saggy *et al.*, 2012). Allerdings ist im Vergleich zu universellen Antikörpergenbibliotheken die Diversität des Antikörperrepertoires gegen eine Vielzahl unterschiedlicher Antigene geringer. Universelle Genbibliotheken repräsentieren die V-Gene von IgM-sekretierenden B-Lymphozyten nicht immunisierter Spender und beinhalten ein Antikörperrepertoire gegen eine Vielzahl von unterschiedlichen Antigenen (Marks *et al.*, 1991). Im Vergleich zu einer Immunbibliothek ist die Affinität der selektierten Antikörper meist geringer, allerdings ist eine nachträgliche Affinitätsreifung der Antikörper möglich (Steinwand *et al.*, 2014; Thie *et al.*, 2009). Des Weiteren können universelle Genbibliotheken in naive-, semisynthetische und synthetische Genbibliotheken unterteilt werden. Bei den naiven Genbibliotheken liegt das Antikörperrepertoire unverändert vor. Semisynthetische Genbibliotheken beinhalten hingegen eine Kombination der Antikörper einer naive Genbibliotheken mit synthetischen CDR-Sequenzen, wobei es sich zumeist um randomisierte CDR3-Regionen handelt (Goletz *et al.*, 2002; Pini *et al.*, 1998). Synthetische Genbibliotheken bestehen aus einem Antikörperrepertoire mit vollständig randomisierten CDR-Kassetten (Hayashi *et al.*, 1994; Knappik *et al.*, 2000).

### 1.5.4 Selektion von Antikörperphagen

Die *in vitro* Selektion von Antikörperphagen aus einer entsprechenden Antikörpergenbibliothek wird auch in Anlehnung an die Goldwäsche als *panning* bezeichnet (Parmley & Smith, 1988) und ist schematisch in Abbildung 1.4 dargestellt. Zunächst wird das Antigen auf einer geeigneten Oberfläche immobilisiert. Diese kann entweder aus Nitrocellulose (Hawlich *et al.*, 2001), magnetischen Partikeln (Moghaddam *et al.*, 2003) oder einer Plastikoberfläche, wie bei Polystyrol-Röhrchen oder Mikrotiterplatten, bestehen (Hust *et al.*, 2002; Chahboun *et al.*, 2011). Die Antikörperphagen werden zunächst mit dem jeweiligen Antigen inkubiert. Anschließend werden ungebundene beziehungsweise schwach bindende Antikörperphagen in einem Waschschrift entfernt. Die Elution spezifisch gebundener Antikörperphagen erfolgt entweder mittels saurem oder alkalischem pH, durch kompetitiver Inhibition der Bindung zwischen Antikörperphage und Antigen, oder mittels proteolytischer Spaltung der Antikörper-pIII-Fusion durch Trypsin (Breitling & Dübel, 1997). Die Amplifikation der eluierten Phagen erfolgt mittels Reinfektion von *E. coli* mit

ausgebildetem F-Pilus und anschließender Koinfektion mit Helferphagen. Die amplifizierten Antikörperphagen werden daraufhin für weitere Selektionsrunden verwendet (Hust *et al.*, 2011).

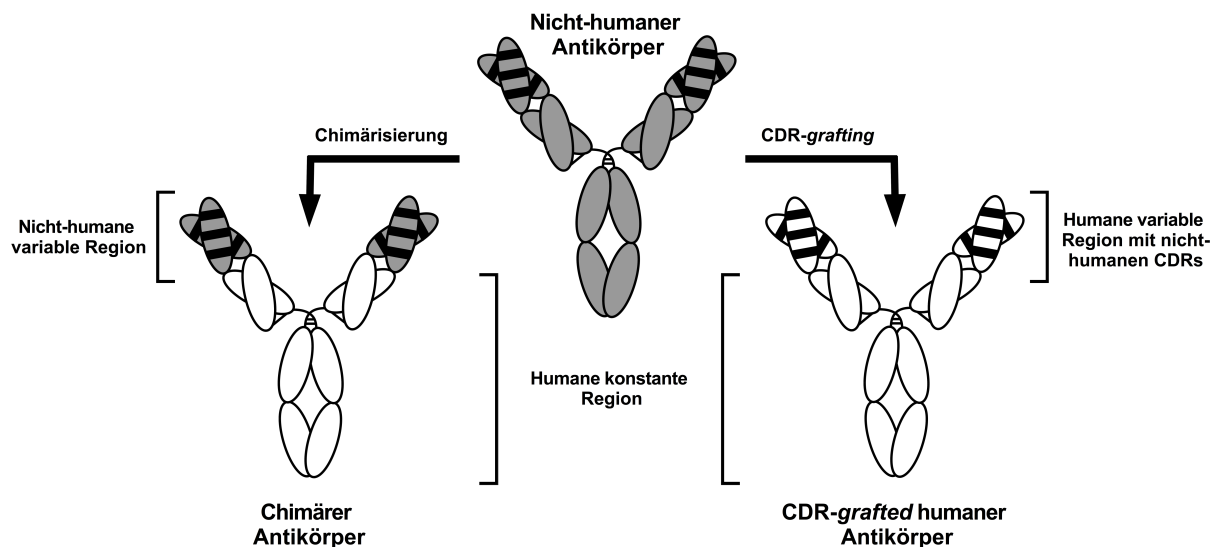


**Abbildung 1.4: Schematische Darstellung der Selektion von scFv-Antikörper mittels Phagen Display.** Antikörperphagen einer Antikörpergenbibliothek werden im sogenannten *panning* hinsichtlich der Spezifität der Antikörperfragmente auf der Phagenoberfläche selektiert. Spezifisch bindende Antikörperphagen werden eluiert und mittels Reinfektion von *E. coli* und Koinfektion mit Helferphagen amplifiziert. Die amplifizierten Antikörperphagen werden in einer weiteren Selektionsrunde eingesetzt beziehungsweise für das *screening* Antigen-spezifischer Antikörperklone verwendet. Anschließend kann die Gensequenz der selektierten Antikörperfragmente für die Produktion verschiedener Antikörperformate verwendet werden.

Üblich sind 2-3 Selektionsrunden in deren Anschluss eine Charakterisierung von Antikörperklonen erfolgt. Dabei werden die eluierten Phagen nicht für eine erneute Amplifikation von Antikörperphagen verwendet, sondern nach Reinfektion von *E. coli* werden Einzelklone selektiert und für die Produktion löslicher Antikörper in entsprechendes Kulturmedium überführt. Die produzierten monoklonalen Antikörper werden anschließend mittels Antigen-ELISA auf deren Spezifität untersucht. Im weiteren Verlauf können die jeweiligen Antikörpergenkassetten in andere Expressionsvektoren kloniert oder für die Generierung alternativer Antikörperformate verwendet werden (Hust *et al.*, 2011). Zudem besteht die Möglichkeit Antikörper, welche aus einer nicht-humanen Antikörpergenbibliothek stammen, mittels unterschiedlicher *in vitro* Verfahren zu humanisieren.

## 1.6 Antikörper-Humanisierung

Bei der therapeutischen Verwendung nicht-humaner Proteine, beispielsweise muriner Antikörper, besteht die Möglichkeit der Ausbildung einer Immunantwort (HAMA, *human anti-mouse antibody*), welche die wiederholte Applikation der Therapeutika erschwert beziehungsweise dessen Wirksamkeit neutralisiert (Schroff *et al.*, 1985; Shawler *et al.*, 1985). Dies gilt für eine Vielzahl monoklonaler Antikörper, welche mittels Immunisierung von Versuchstieren generiert wurden. Üblich ist hierbei die Verwendung von Mäusen, Ratten oder Kaninchen (Steinberger *et al.*, 2000), aber auch Schimpansen und Makaken eignen sich zur Generierung therapeutischer Antikörper (Avril *et al.*, 2013). Die potenzielle Immunogenität solcher Antikörper lässt sich durch molekularbiologische Methoden reduzieren. Die Herausforderung dabei besteht darin die Spezifität sowie Affinität des ursprünglichen Antikörpers während der Humanisierung aufrecht zu erhalten. In einigen Fällen führte die Humanisierung gar zu einer verbesserten Affinität der Antikörper (Brams *et al.*, 2001; Luo *et al.*, 2003). Eine Vielzahl von Strategien wurde entwickelt um die Immunogenität nicht-humaner Antikörper für den therapeutischen Einsatz zu reduzieren. Eine der ersten Methoden war die Generierung chimärer Antikörper bei denen die xenogenen variablen Domänen der leichten und schweren Kette mit den humanen konstanten Domänen fusioniert wurden (Boulianne *et al.*, 1984; Morrison *et al.*, 1984). Die so erzeugten chimären Antikörper sind zu zwei Drittel human und weisen eine reduzierte Immunogenität auf. In vorangegangenen Versuchen wurde gezeigt, dass ein Großteil der durch nicht-humane Antikörper hervorgerufenen Immunantwort auf den Fc-Teil zurückzuführen ist (Kuus-Reichel *et al.*, 1994). Jedoch kann auch die variable Domäne zu einer relevanten Immunantwort führen (LoBuglio *et al.*, 1989) und es kommt immer wieder bei einem therapeutischen Einsatz von chimären Antikörpern zu einer HACA-Antwort (*human anti-chimeric antibody*). Ein weiterer Schritt zur Reduzierung der Immunogenität nicht-humaner Antikörpern ist das sogenannte CDR-*grafting*. Hierbei werden lediglich die hypervariablen Regionen (CDRs) in ein humanes Antikörpergerüst transplantiert (Abbildung 1.5). Der erste therapeutische Antikörper, bei dem alle 6 CDRs eines Ratten-Antikörpers in ein humanes Antikörpergerüst transplantiert wurde, konnte 1988 generiert werden (Riechmann *et al.*, 1988). Dieser Antikörper wird als Campath (Alemtuzumab) vermarktet und wurde 2001 zur Behandlung von chronischer lymphatischer Leukämie in den USA und der EU zugelassen. Antikörper, welche mittels CDR-*grafting* humanisiert wurden, weisen im klinischen Einsatz nahezu keine Immunogenität auf (Hale *et al.*, 1988). Allerdings führt die alleinige Transplantation der CDRs meist zu einer reduzierten Affinität des Antikörpers, welches darauf schließen lässt, dass die Antigenbindung nicht allein durch die Ausprägung der hypervariablen Domänen charakterisiert ist, sondern auch durch einzelne Mutationen in den *framework* Regionen beeinflusst wird (Dübel, 2007).

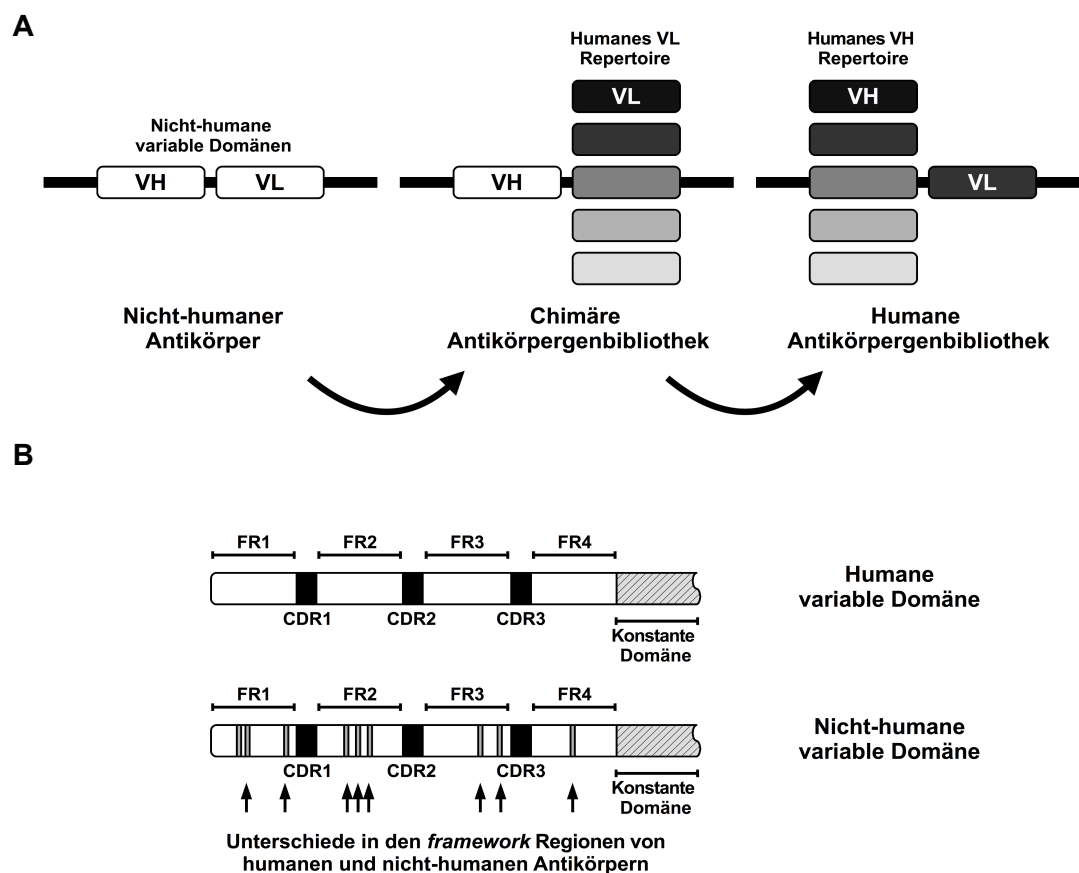


**Abbildung 1.5: Schematische Darstellung der Humanisierung eines nicht-humanen Antikörpers mittels Chimärisierung und CDR-grafting.** Dargestellt ist die Humanisierung eines Antikörpers mittels Chimärisierung, bei dem die nicht-humanen variablen Domänen mit humanen konstanten Domänen fusioniert werden, sowie die Humanisierung mittels CDR-grafting, bei dem die CDRs eines nicht-humanen Antikörpers in einen humanen Antikörper transplantiert werden.

Eine weitere Methode zur Humanisierung von nicht-humanen Antikörpern ist das *chain shuffling* (Kuepper *et al.*, 2005). Hierbei wird zunächst eine chimäre Antikörpergenbibliothek generiert, bei der die VL des nicht-humanen Antikörpers durch das VL Repertoire einer humanen Antikörpergenbibliothek ersetzt wird. Die daraus resultierende chimäre Antikörpergenbibliothek wird für eine erneute Selektion von spezifischen Antikörperphagen verwendet. Im Anschluss erfolgt der Austausch der nicht-humanen VH der selektierten Antikörper durch das VH Repertoire der humanen Antikörpergenbibliothek und die erneute Selektion von spezifischen Antikörperphagen. Die aus dem *chain shuffling* resultierenden Antikörper sind somit zu 100 % humanen Ursprungs (Abbildung 1.6, A). Eine dem *chain shuffling* verwandte Methode ist das *framework shuffling*, bei der die CDRs des nicht-humanen Antikörpers mit dem Repertoire humaner *framework* Regionen zu einer neuen Antikörpergenbibliothek zusammengefügt wird (Dall’Acqua *et al.*, 2005). Die aus dem *framework shuffling* resultierende Antikörpergenbibliothek verfügt über eine hohe Diversität an humanen *framework* Kombinationen in Verbindung mit den ursprünglichen CDRs und wird für die Selektion von Antikörperphagen gegen das jeweilige Antigen verwendet.

Des Weiteren lassen sich nicht-humane Antikörper mittels *Super-Humanization* beziehungsweise *Germlinization* humanisieren (Tan *et al.*, 2002; Pelat *et al.*, 2008). Bei dieser Methode werden die *framework* Regionen der nicht-humanen Antikörper mit den humanen Keimbahnlinien verglichen und etwaige Unterschiede bezüglich der Sequenz angeglichen (Abbildung 1.6, B). Es wird davon ausgegangen, dass Antikörper, welche eine hohe Übereinstimmung zu den humanen Keimbahn-

linien aufweisen, eine hohe Immuntoleranz besitzen. Diese Methode eignet sich vor allem zur Humanisierung von Antikörpern nicht-humaner Primaten, da hier bereit eine hohe Sequenzhomologie in den *framework* Regionen besteht (Pelat & Thullier, 2009; Thullier *et al.*, 2010).



**Abbildung 1.6: Schematische Darstellung der Humanisierung von Antikörpern mittels *chain shuffling* und *Germlinization*.** **A)** Humanisierung mittels *chain shuffling*. Generierung einer chimären Antikörpergenbibliothek über den Austausch der VL Domäne eines nicht-humanen Antikörpers mit dem VL Repertoire einer humanen Antikörpergenbibliothek sowie der darauffolgende Austausch der VH Domäne. **B)** Humanisierung mittels *Germlinization*. Unterschiede in den *framework* Regionen der nicht-humanen Antikörper werden den humanen Keimbahnlinien mit der höchsten Homologie angeglichen.

## 1.7 Botulismus und Botulinum Neurotoxin

### 1.7.1 Botulismus

Eine durch *Clostridium botulinum* und weitere *Clostridium spp.* hervorgerufene Erkrankung, welche mit einer Lebensmittelvergiftung assoziiert wird, wurde erstmals Anfang des 19. Jahrhunderts näher charakterisiert. Die erste systematische Untersuchung mehrerer in Süddeutschland aufgetretener Krankheitsfälle wurde 1817 von Justinus Kerner durchgeführt. Im späteren Verlauf wurde die durch ihn beschriebene Erkrankung als Botulismus, abgeleitet vom lateinischen *botulus*

(Wurst), bezeichnet, da die ersten Fälle dieser Art von Lebensmittelvergiftung durch den Verzehr verdorbener Würste verursacht wurden (Häfner, 2009; Pellett, 2012). Jedoch blieb zu diesem Zeitpunkt die eigentliche Ursache für diese Erkrankung unbekannt. Erst 1897 gelang es Pierre Marie van Ermengem das sporenbildende Gram-positive, anaerobe Bakterium, welches für Botulismus verantwortliche ist, zu isolieren (van Ermengem, 1979). Zudem beschrieb van Ermengem ein von *C. botulinum* erzeugtes Toxin, welches später als Serotyp A bezeichnet wurde und in Tierversuchen die Botulismus typischen Symptome verursachte. Hierbei handelt es sich um eine durch Botulinum Neurotoxin (BoNT) hervorgerufene systemische Intoxikation, welche durch eine Muskelparalyse charakterisiert wird. Zusätzlich zur Lebensmittelvergiftung assoziierten Form des Botulismus wurde 1943 der Wundbotulismus beschrieben, welcher durch die Infektion von Wundgewebe mit *Clostridium botulinum* hervorgerufen wird (Davis *et al.*, 1951). Eine dritte Form stellt der 1976 beschriebene Säuglingsbotulismus da (Midura & Arnon, 1976). In den meisten Fällen von Säuglingsbotulismus ist die Quelle der Toxinaufnahme nicht bekannt, doch wird in 15 % der Intoxikationen der Verzehr von Honig und den dort befindlichen Sporen von *Clostridium botulinum* vermutet (Shapiro *et al.*, 1998). Eine weitere Form des Botulismus ist durch die Kolonisierung des Gastrointestinaltraktes charakterisiert und wurde erstmals 1986 beschrieben (Chia *et al.*, 1986). Meist ist diese Form des Botulismus mit Darmoperationen, Morbus Crohn oder durch den Verzehr kontaminierter Lebensmittel ohne direktem Krankheitsausbruch assoziiert (Hatheway, 1995). Auch durch den vermehrten klinischen Einsatz von Botulinum Neurotoxin kommt es in seltenen Fällen zu einem versehentlich herbeigerufenen Botulismus (Bhatia *et al.*, 1999).

### 1.7.2 Botulinum Neurotoxin

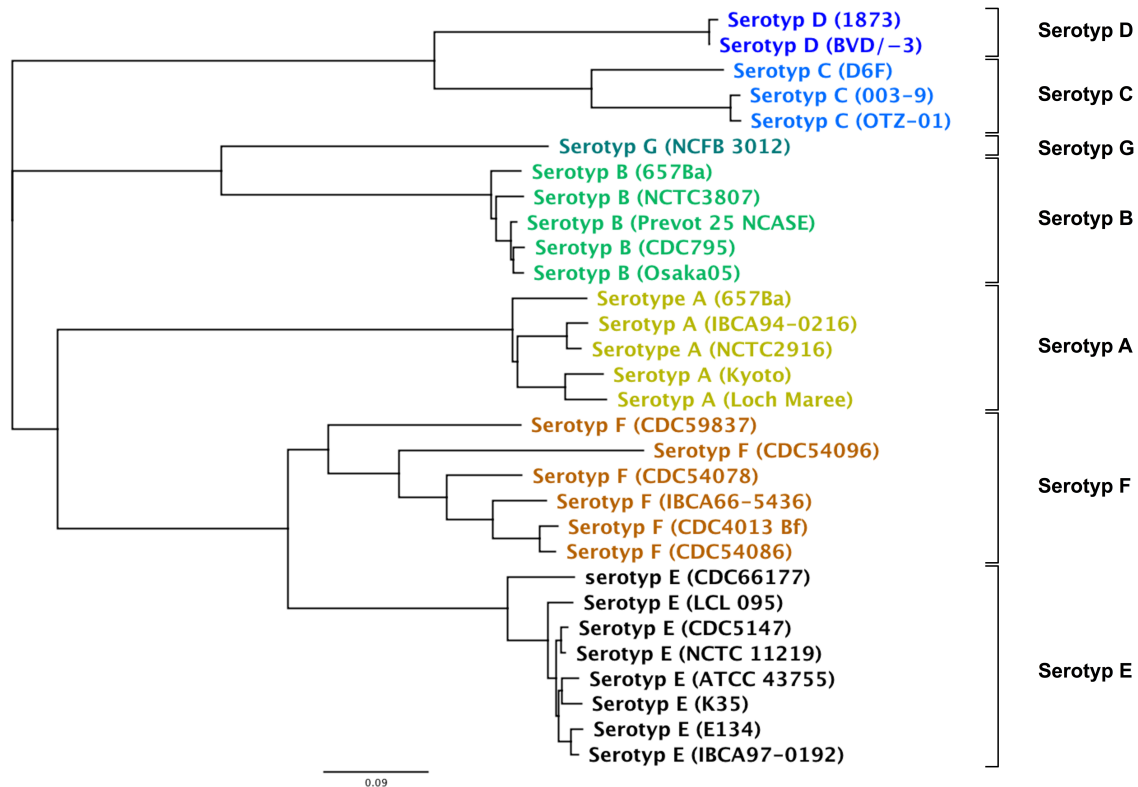
Sämtliche bisher bekannten Botulinum Neurotoxine werden in 8 Serotypen (A-H) unterteilt (Barash & Arnon, 2014; Dover *et al.*, 2014), welche wiederum von vier unterschiedlichen *Clostridium botulinum* Gruppen (I-IV) produziert werden (Tabelle 1.1). Zusätzlich zu den vier Gruppen von *Clostridium botulinum* sind weitere *Clostridien ssp.* wie etwa *Clostridium argentinense*, *Clostridium barati* und *Clostridium butyricum* fähig Botulinum Neurotoxin zu produzieren (Popoff & Bouvet, 2013). Die Unterscheidung der Serotypen erfolgt mittels immunologischem Nachweis, bei dem die Kreuzneutralisation von Serotyp-spezifischen Maus-Antiseren getestet wird. Des Weiteren erfolgt auf genetischer Ebene eine Unterteilung in weitere Subtypen (Dorner *et al.*, 2013) (Abbildung 1.7).

**Tabelle 1.1: Phänotypische Unterteilung von *Clostridium botulinum* Stämmen.** Klassifizierung der unterschiedlichen *Clostridium botulinum* Stämme sowie einiger Botulinum Neurotoxin produzierenden *Clostridium ssp.* in die vier phänotypischen Gruppen. Modifiziert nach Peck (2009).

<i>Clostridium botulinum</i> Gruppe						
	I	II	III	IV*	<i>C. bariti</i>	<i>C. butyricum</i>
Serotyp	A, B, F, H	B, E, F	C, D	G	F	E

\* *C. argentinense* wurde in Gruppe IV eingeordnet (Hatheway, 1995)

Für den humanen Botulismus sind hauptsächlich die Serotypen A, B, E und in seltenen Fällen Serotyp F verantwortlich (Sobel, 2005). Lediglich 1 % der durch Botulinum Neurotoxin bedingten Lebensmittelvergiftungen steht im Zusammenhang mit einer Serotyp F Intoxikation (Liu *et al.*, 2012) und der erst 2013 isolierte Serotyp H wurde bisher nur in einem Fall von Säuglingsbotulismus in den USA nachgewiesen (Barash & Arnon, 2014). Mit einem LD<sub>50</sub> Wert (Letale Dosis) von 1 ng/kg intravenöser und subkutaner Applikation beziehungsweise 3 ng/kg pulmonaler Applikation ist BoNT/A das potenteste Toxin, welches bisher bekannt ist. Bei diesen Werten handelt es sich jedoch um eine hypothetische Dosis, welche sich aus Experimenten mit nicht-humanen Primaten ableitet (Gill, 1982). Aufgrund seiner Toxizität und einfachen Produktion wurde BoNT vom *Centers of Disease Control and Prevention* (CDC) als potenzielle Biowaffe der Kategorie A klassifiziert und repräsentiert eines von 6 Agenzien mit der höchsten Risikobewertung (Arnon *et al.*, 2001; Froude *et al.*, 2011). Bei einer durch Botulinum Neurotoxin assoziierten Vergiftung kommt es innerhalb von 12-36 h nach Aufnahme des Toxins zu Kopf- und Gliederschmerzen, Trockenheit im Mund und starker Übelkeit, gefolgt von Lähmungen der inneren und äußeren Augenmuskulatur und anschließend der Schluckmuskulatur. Zudem treten Miktions- und Obstipationbeschwerden auf. Im fortgeschrittenen Stadium tritt der Tod durch Paralyse der Atemmuskulatur ein. Bei Verdacht einer Intoxikation durch BoNT ist eine sofortige Hospitalisierung und intensivmedizinische Überwachung erforderlich. Der Nachweis des Toxins erfolgt meist über eine Serum- oder Stuhlprobe des Patienten beziehungsweise einer Probe der zuvor verzerrten Lebensmittel (Kreyden *et al.*, 2000). Verschiedene Nachweismethoden finden hierbei Verwendung. Zum Einen werden Bioassays zum Nachweis der Toxine und entsprechenden Serotypen verwendet, bei denen eine intraperitoneale Injektion von Patientenserum oder homogenisierten Proben in Mäuse erfolgt. Bei einem positiven Befund tritt der Tod der Versuchstiere innerhalb von 2-96 h ein. Zum Anderen erfolgt der Nachweis über die Kultivierung von *Clostridium botulinum* oder PCR basierenden Nachweismethoden (Grenda *et al.*, 2014).



**Abbildung 1.7: Phylogenetische Analyse von BoNT Serotypen und einiger zugehörigen Subtypen.** Der phylogenetischer Stammbaum (bezogen auf Aminosäureebene) wurde mit der *neighbor-joining* Methode sowie dem *Jukes-Canto* Model erstellt und repräsentiert eine Auswahl von Subtypen der 7 Botulinum Neurotoxin Serotypen A-G mit Angabe des zugehörigen Stammes (Klammern). Botulinum Neurotoxin H wurde nicht berücksichtigt (Sequenzdaten nicht zugänglich).

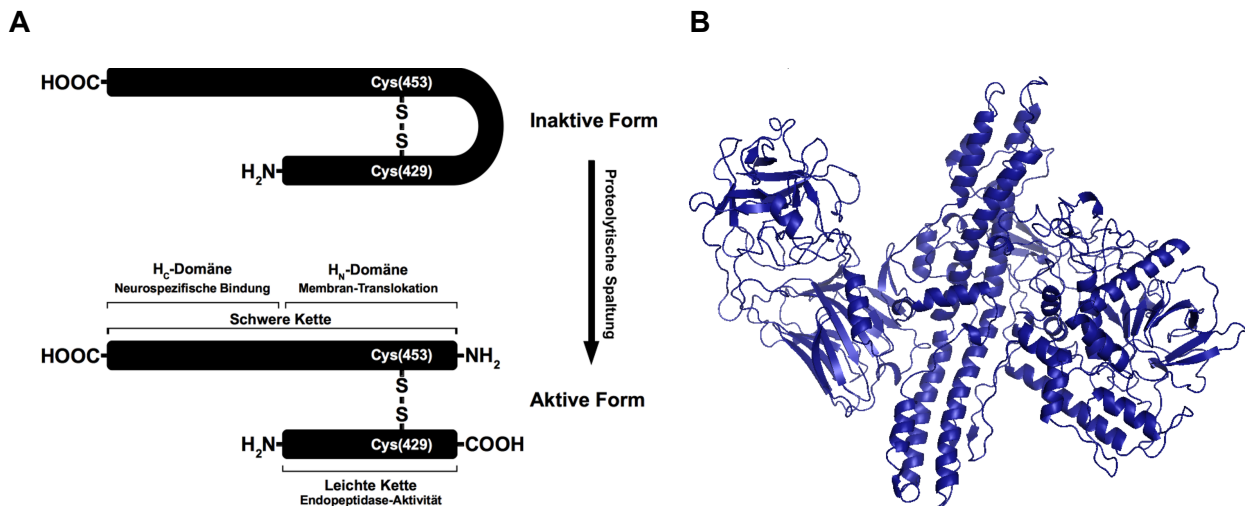
Allerdings wird bereits bei Verdacht auf Botulismus spezielle Antiseren verabreicht. Zusätzlich zur Serumtherapie erfolgt bei einer Kolonisierung des Gastrointestinaltraktes oder bei Wundbotulismus die Verabreichung von Antibiotika. Der bisherige Ansatz mit Antiseren beruht auf einer passiven Immunisierung mit Pferdeantiserum (Hibbs *et al.*, 1996) oder humanen anti-Botulismus Immunglobulinen, wie etwa BabyBig® (Arnon *et al.*, 2001). Jedoch ist der Vorrat an Humanserum limitiert und die Verwendung von Pferdeantiserum birgt das Risiko einer Hypersensitivität beziehungsweise Serumkrankheit (Black & Gunn, 1980). Die Strategie bei Verwendung dieser Antitoxine besteht darin die entsprechenden Toxine aus der Blutzirkulation zu entfernen bevor es zu einer Internalisierung in die Neuronen kommt. Jedoch verlieren die Therapeutika an Effektivität sobald die Paralyse einsetzt. Für spezielle Risikogruppen, wie etwa Personal von Gesundheitsorganisationen, Forschungseinrichtungen sowie militärisches Personal, besteht die Möglichkeit einer Immunisierung mit BoNT-Toxoid (Byrne & Smith, 2000). Eines der ersten verfügbaren Toxoide war das pentavalente (ABCDE) Botulinum Toxoid, welches durch eine Formalin Inaktivierung generiert wurde (Smith & Rusnak, 2007). Jedoch verliert das Toxoid während einer längeren Lagerung an Effektivität, weshalb der Vertrieb durch das CDC, nach dem das Präparat 30



Jahre auf dem Markt war, eingestellt wurde (Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2011). Zudem wäre eine flächendeckende Immunisierung gegen Botulismus hinsichtlich der breiten medizinischen Anwendung von Botulinum Neurotoxin nicht anwendbar. So finden diverse Präparate basierend auf BoNT Anwendung in der Humanmedizin. Beispielsweise wurde erstmals 1980 BoNT zur Behandlung von Strabismus (griech.; *strabismós* „Schielen“) eingesetzt. Weitere Anwendungsgebiete finden sich in der Behandlung von Spasmen, wie etwa Blepharospasmus oder Spasmus hemifacialis, axillärer Hyperhidrose, Erkrankungen des Gastrointestinaltraktes oder auch bei chronischer Migräne. Eines der wohl populärsten Anwendungsgebiete ist der kosmetische Einsatz von BoNT (Chen, 2012).

### 1.7.3 Struktur und Wirkungsmechanismus von Botulinum Neurotoxin

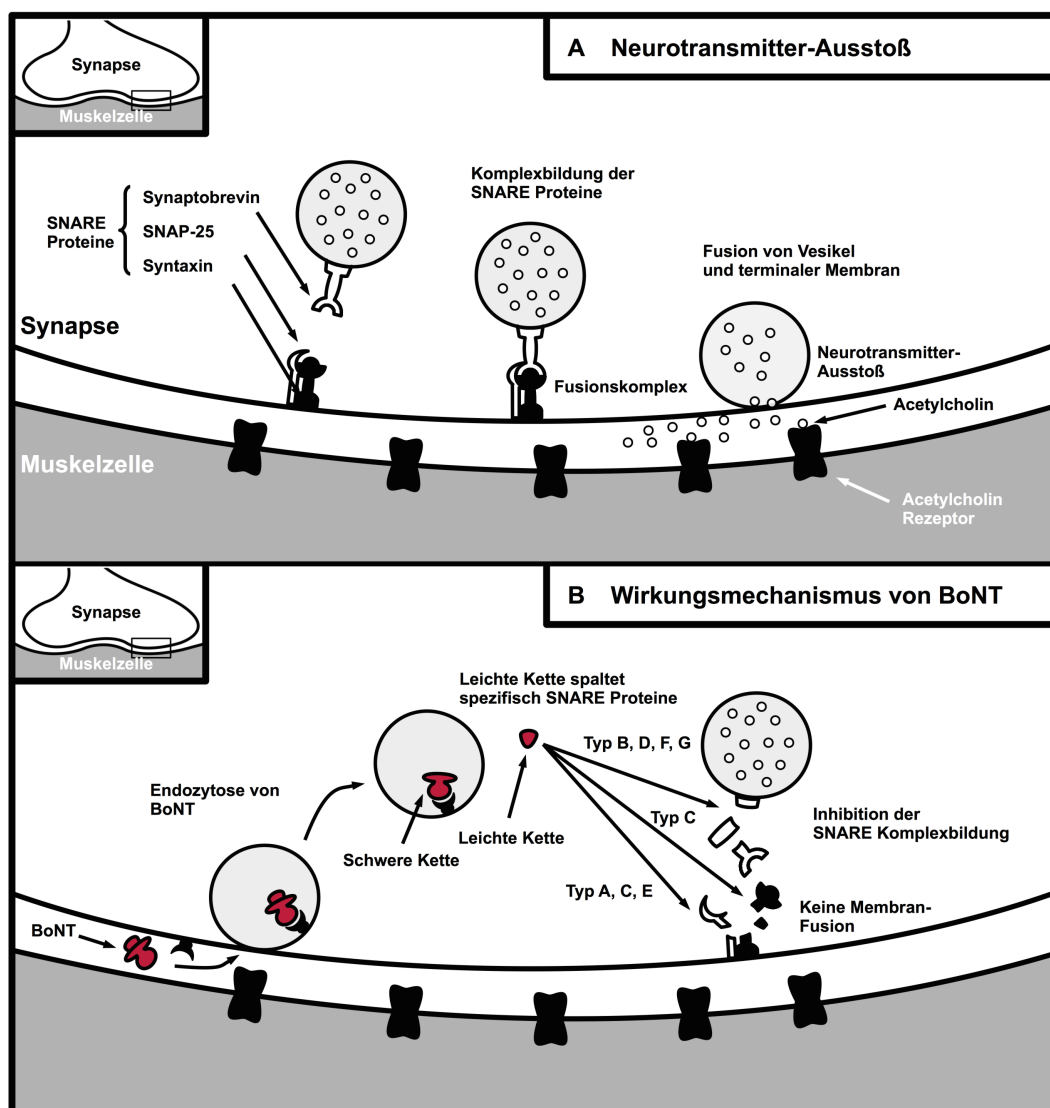
Botulinum Neurotoxin wird als Multimerkomplex in Verbindung mit nicht-toxischen Proteinen, sogenannten Neurotoxin-assoziierten Proteinen (NAP), sekretiert und in drei Komplexformen eingeordnet. Hierbei handelt es sich, abhängig vom jeweiligen Serotyp, um die Proteinkomplexe 19S (900 kDa), 16S (500 kDa) und 12S (300 kDa). Der 12S-Komplex besteht aus BoNT und NTN, einer nicht-toxischen Komponente ohne Hämagglutinin-Aktivität. Der Komplex 16S besteht hingegen aus BoNT, NTN und drei weiteren Hämagglutininen (HA1, HA2 und HA3). Bei dem 19S-Komplex wird angenommen, dass es sich hierbei um ein 16S-Dimer handelt (Amatsu *et al.*, 2013). Durch die nicht-toxischen Proteine (HA und NTN) wird die Stabilität von BoNT gegenüber niedrigen pH-Werten und Proteasen im Gastrointestinaltrakt erhöht, welches zu einer gesteigerten Toxizität von BoNT nach oraler Aufnahme führt (Sakaguchi, 1982). Zudem trägt HA wesentlich zur Toxin-Absorption im Gastrointestinaltrakt bei, indem es an intestinale Epithelzellen bindet und an der Überwindung der interzellulären Barriere der Epithelzellen beteiligt ist (Fujinaga *et al.*, 2013). Zunächst wird Botulinum Neurotoxin in seiner nicht-toxischen Form als einzelkettiges Protoxin (150 kDa) produziert, bevor es durch proteolytische Spaltung in seine aktive Form umgewandelt wird. In der aktiven Form besteht BoNT aus einer leichten (50 kDa) und schweren Kette (100 kDa), welche durch eine Disulfidbrücke kovalent miteinander verknüpft sind (Gu & Jin, 2013) (Abbildung 1.8).



**Abbildung 1.8: Struktur von Botulinum Neurotoxine.** A) Schematische Darstellung von Botulinum Neurotoxin A in seiner inaktiven sowie aktiven Form, bestehend aus schwerer und leichter Kette. B) 3D Struktur von Botulinum Neurotoxin A (RCSB Protein Data Bank, 3BTA)

Die durch Botulinum Neurotoxin hervorgerufene Paralyse wurde erstmals 1980 in ihrem Wirkungsmechanismus in drei Stufen unterteilt, hierbei liegt das Augenmerk auf die Toxinbindung, Internalisierung und intrazelluläre Toxizität (Simpson, 1980). Im ersten Schritt kommt es zur Membranbindung der C-terminalen Domäne der schweren Kette an die Axonenden somatomotorischer und vegetativer Neuronen (Dolly *et al.*, 1984). Hierbei erfolgt die Bindung an Ganglioside sowie Proteinrezeptoren (Montecucco, 1986) und führt zu einer Rezeptor-vermittelten Endozytose des Toxins (Black & Dolly, 1986). Durch den im Endosomen vorherrschenden niedrigen pH-Wert kommt es daraufhin zur Strukturveränderung der N-terminalen Translokations-Domäne, welche zur Porenbildung in der Endosomenmembran führt. Dies ermöglicht der leichten Kette in das Zytoplasma zu gelangen und in einem dritten Schritt die an der Fusion der synaptischen Vesikel mit der Membran beteiligten Proteine zu spalten. Je nach Serotyp werden unterschiedliche Proteine des SNARE-Komplexes (*soluble N-ethyl-maleimide-sensitive factor attachment protein receptor*) gespalten. Die Serotypen B, D, F und G spalten Synaptobrevin, auch als VAMP (*vesicle-associated membran protein*) bezeichnet. Die Serotypen A, C und E spalten SNAP-25 (*synaptosomal-associated protein of 25 kDa*), zudem spalten Serotyp C zusätzlich Syntaxin. Die Inaktivierung nur eines der am SNARE-Komplex beteiligten Proteine führt dazu, dass die mit Acetylcholin gefüllten Vesikel nicht mit der präsynaptischen Membran verschmelzen und die Ausschüttung von Acetylcholin in den synaptischen Spalt verhindert wird (Abbildung 1.9). Dies führt zu einer Hemmung der Erregungsübertragung zu den motorischen Endplatten und damit verbundenen schlaffen Lähmung (Arnon *et al.*, 2001). Die vollständige Regeneration der SNARE-Proteine benötigt meist mehrere Monate und nach einer überstandenen Intoxikation leiden die Patienten über einen längeren Zeitraum über körperliche Schwäche bis hin zu Atemnot. Da die

toxische Dosis zumal niedriger ist als die immunogene Dosis, ist unklar ob eine Immunität entsteht. Aus der therapeutischen Anwendung von Botulinum Neurotoxin ist allerdings bekannt, dass einige Patienten Antikörper gegen BoNT bilden (Bigalke & Frevert, 2012).



**Abbildung 1.9: Wirkungsmechanismus von Botulinum Neurotoxin. A)** Neurotransmitter Ausstoß eines Neurons in den synaptischen Spalt. **B)** Wirkungsmechanismus der einzelnen Serotypen von Botulinum Neurotoxin und die Inhibition des Neurotransmitter Ausstoßes durch proteolytische Spaltung der am SNARE-Komplex beteiligten Proteine.

## 1.8 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Dissertation ist die Generierung neutralisierender Antikörper gegen die leichte Kette von BoNT/A1 im Rahmen des AntiBotABE Projektes, welches sich die Entwicklung eines oligoklonalen Antikörperpräparates zur Behandlung von Botulismus zum Ziel gesetzt hat.

Besonders die für den humanen Botulismus relevanten Serotypen A, B und E liegen hierbei im Focus. Ausgangspunkt für die Generierung neutralisierender Antikörper soll die Immunisierung von nicht-humanen Primaten (*Macaca fascicularis*) sein. Das IgG Repertoire soll anschließend Grundlage für eine Antikörpergenbibliothek sein, aus der mittels Phagen Display Technologie hoch-affine Antikörper gegen die leichte Kette von BoNT/A1 selektiert werden. Die selektierten Antikörper sollen daraufhin näher charakterisiert und auf deren potenzielle Toxin-Neutralisation untersucht werden. Im weiteren Verlauf soll der vielversprechendste Antikörper mit der besten Toxin-Neutralisation mittels *Germlinization* humanisiert und ins IgG-Format konvertiert werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Verbrauchsmaterial

**Tabelle 2.1: Verwendetes Verbrauchsmaterial**

Material	Hersteller
CM5 Chip (Biacore)	GE Healthcare, München
Einmal-Küvetten	Brand GmbH, Wertheim
Einwegspatel (Steril)	VWR, Darmstadt
Elektroporationsküvetten Gene pulser 0,1 cm	Bio-Rad, München
Filter Celluloseacetat (0,2 µm; 0,45 µm; 0,8 µm)	Sartorius Stedim Biotech, Melsungen
Filterpapier (3 mm)	Bio-Rad, München
Injektionsspritzen	B.Braun Biotech International GmbH, Melsungen
Kanülen	B.Braun Biotech International GmbH, Melsungen
Mikroschraubröhrchen 2 ml PP	Sarstedt, Nümbrecht
Mikrotiterplatten MaxiSorp 96 <i>well</i>	Nunc, Roskilde
Parafilm	American National Can, Chicago
Petrischale 70x20 mm	Greiner Bio-one, Frickenhause
Petrischale 150x20 mm	Greiner Bio-one, Frickenhause
Pipettenspitzen (10 µL; 200 µL, 1000 µL)	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen, Filter (10 µL; 200 µL, 1000 µL)	Sarstedt, Nümbrecht
Polycarbonat-Erlenmeyerkolben mit Entlüftungskappe (125 mL)	Corning, New York
Polypropylen Mikrotiterplatten 96 <i>well</i>	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Polypropylen-Röhrchen (15 ml; 50 mL)	Corning, New York
Polystyrol Abdeckplatte (Mikrotiterplatten)	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Probengefäße, Glas (Biacore)	Chromacol LTD, Hertfordshire
Probengefäße, Polypropylen (Biacore)	Gilson, Middleton
PVDF-Membran T830.1	Carl Roth, Karlsruhe
Reaktionsgefäß (1,5 mL; 2 mL)	Sarstedt, Nümbrecht
Serologische Pipetten (2,5 mL; 5 mL; 10 mL; 25 mL)	Corning, New York

## 2.1.2 Säulen und Kit-Systeme

**Tabelle 2.2: Verwendete kommerzielle Säulen und Kit-Systeme**

Säulen und Kit-Systeme	Hersteller
Bio-Scale™ Mini Bio-Gel P-6 Desalting Cartridge	Bio-Rad, München
Bio-Scale™ Mini UNOsphere SUPrA Cartridge	Bio-Rad, München
NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up	Macherey-Nagel, Düren
NucleoSpin® Plasmid	Macherey-Nagel, Düren
NucleoBond Xtra Midi	Macherey-Nagel, Düren
Superdex200 increase 10/300 GL	GE Healthcare, München

## 2.1.3 Geräte

**Tabelle 2.3: Verwendete Geräte**

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Aufzeichnungsgerät	PowerLab/4SP 4	ADInstruments, Oxford
Blot Apparatur	Blot-Apparatur Trans-Blot Semi-Dry Transfer Cell	Bio-Rad, München
Chromatographieapparatur	Äkta purifier	GE Healthcare, München
	Profinia purification	GE Healthcare, München
Elektroporator	Mikropulser	Bio-Rad, München
ELISA Apparatur	Reader Tecan SUNRISE	Tecan, Crailsheim
ELISA Waschapparatur	Columbus plus	Tecan, Crailsheim
	hydroSPEED	Tecan, Crailsheim
Filtrationseinheit	Nalge	Nunc, Wiesbaden
Geldokumentation	ChemiDoc™ MP Imaging System	Bio-Rad, München
	Geldokumentation	Intas, Göttingen
Inkubatoren	BE400	Memmert Omnilab, Schwabach
	HeraCell	Heraeus Instruments, Hanau
Isometrischer Kraftmesser	GM2 type	FMI, Seeheim-Ober Beerbach
Lichtmikroskope	Eclipse TS100-F	Nikon, Tokio
Messbrückenverstärker	Bridge Amp ML110	ADInstruments, Oxford
Netzgeräte	EPS 301	Amersham Pharmacia, München
	PowerPac HC	Bio-Rad, München
PCR Gerät	Thermocycler DNA-Engine	Bio-Rad, München
Pipettierhilfe	Accu-jet	Brand, Wertheim
	Biohit e1200	Biohit, Helsinki
	Research	Eppendorf, Hamburg

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
pH-Meter	CG810	Schott, Mainz
Photometer	Libra S11	Biochrom, Berlin
	NanoDrop ND-1000	Peglab Biotech. GmbH, Erlangen
Reinstwasseranlage	arium 611	Sartorius, Göttingen
Schüttelinkubatoren	Certomat® BS-1	B.Braun Biotech International GmbH, Melsungen
	Minitron	INFORS HT, Bottmingen
	Mixin Block MB-120	Bioer Technology, Binjiang
	Multitron	INFORS HT, Bottmingen
	Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg
SPR-Messgerät	Biacore X	GE Healthcare, München
Sterilbänke	HeraSafe	Heraeus Instruments, Hanau
	MSC-Advantage	Thermo Scientific, Waltham
Vakuumpumpe	Vakuumpumpe	KNF Laboport, New York
Vortexmischer	Vortex genie 2	Scientific Industries, New York
Waagen	1203 MP	Sartorius, Göttingen
	Analytic A 120S	Sartorius, Göttingen
	EMB 220-1	Kern, Balingen-Frommern
Wasserbad	Wasserbad GFL	Laborbedarf, Braunschweig
Zentrifugen	Eppendorf 5415D	Eppendorf, Hamburg
	Eppendorf 5810R	Eppendorf, Hamburg
	Multifuge 3 S-R	Heraeus Instruments, Hanau
	Sorvall RC6 Plus	Thermo Electron Corporation, Waltham

#### 2.1.4 Chemikalien, Lösungen und Puffer

Sämtliche verwendeten Chemikalien entsprachen der Reinheitsklasse *p.a.* (*pro analysi*) und wurden, sofern nicht anders vermerkt, von den Firmen Carl Roth (Karlsruhe), Fermentas (St. Leon Rot), Merck (Darmstadt), Roche (Mannheim) und Sigma-Aldrich (Fluka, Riedel-de Haën) bezogen. Lösungen und Puffer wurden mit Reinstwasser angesetzt und anschließend autoklaviert, Temperaturempfindliche Substanzen wurden hingegen sterilfiltriert.

**Tabelle 2.4: Verwendete Chemikalien, Lösungen und Puffer**

Bezeichnung	Komponente	Konzentration
Allgemein		
20x PBS	NaCl	2,7 M
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	160 mM
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	35 mM
	KCl	54 mM
Glycerin	Glycerin, steril	80 % (v/v)
TBS (pH 8,0)	NaCl	137 mM
	KCl	2,7 mM
	Tris	50 mM
Tween 20	Tween 20 (Fluka)	Finale Konzentration 0,05 %
Affinitätschromatographie (Protein A)		
5x Binde-, Wasch-, Equilibrierungs- und Entsalzungspuffer	NaCl	685 mM
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	21,5 mM
	KCl	13,5 mM
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	40,5 mM
2x Reinigungslösung I (pH 8,0)	NaCl	2 M
	Tris	100 mM
2x Lagerungslösung	Benzylalkohol	4 % (v/v)
4x Reinigungslösung II (pH 4,5)	Natriumacetat	400 mM
5x Elutionspuffer	NaCl	1 M
	Natriumcitrat	500 mM
20 % Ethanol	Ethanol	20 % (v/v)
Agarose-Gelelektrophorese		
6x DNA-Ladepuffer	Bromphenolblau	0,25 % (w/v)
	Glycerin	30 % (v/v)
	Xylene Cyanol FF	0,25 % (w/v)
Agarose	Agarose	1-2,5 % (w/v)
Ethidiumbromidlösung	Ethidiumbromid	25 mM
TAE-Laufpuffer (pH 8,0)	EDTA	1 mM
	Essigsäure	2 mM
	Tris HCl	4 mM
Chemokompetente <i>E. coli</i> -Zellen		
TFB1 (pH 5,8)	CaCl <sub>2</sub>	10 mM
	Glycerin	15 % (v/v)
	Kaliumacetat	30 mM
	MnCl <sub>2</sub>	50 mM



Bezeichnung	Komponente	Konzentration
Chemokompetente <i>E. coli</i> -Zellen		
TFB1 (pH 5,8)	RbCl	100 mM
TFB2 (pH 8,0)	CaCl <sub>2</sub>	75 mM
	Glycerin	15 % (v/v)
	RbCl	10 mM
	Morpholin-3-Propansulfonsäure (MOPS)	10 mM
Coomassie-Färbung		
Entfärbelösung	Essigsäure	10 % (v/v)
Färbelösung	Coomassie Brilliant Blue R250	0,05 % (w/v)
	Essigsäure	10 % (v/v)
	Isopropanol	30 % (v/v)
DNA Präzipitation		
Ethanol	Ethanol	70 % sowie 96 % (v/v)
Natriumacetat-Lösung (pH 5,2)	Natriumacetat	3 M
<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)</i>		
Blocklösung	Milchpulver gelöst in PBS	2-2,5 % (w/v)
	Tween 20	0,05 % (v/v)
Lösung A (pH 4,1)	Tri-Kaliumcitrat	30 mM
	Zitronensäure	50 mM
Lösung B	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB)	1 mM
	Aceton	10 % (v/v)
	Ethanol	90 % (v/v)
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0,3 % (v/v)
Stopplösung	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1 N
TMB-Reagenz	Lösung A	95 % (v/v)
	Lösung B	5 % (v/v)
Waschlösung	Tween 20 in PBS	0,05 % (v/v)
<i>Ex vivo Nervus phrenicus hemidiaphragma Assay</i>		
Krebs-Gelatine-Puffer (4x)	Gelatine	0,8 % (w/v)
	KCl	19,32 mM
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4,76 mM
	NaCl	472 mM
Generierung von Antikörpergenbibliotheken/Antikörper Phagen Display		
Blocklösung	Milchpulver in PBS	2 % (w/v)
	Tween 20	0,05 % (v/v)

## Material und Methoden

Bezeichnung	Komponente	Konzentration
Generierung von Antikörpergenbibliotheken/Antikörper Phagen Display		
<i>Panning</i> Blocklösung	BSA in PBS	1 % (w/v)
	Milchpulver in PBS	1 % (w/v)
	Tween 20	0,05 % (v/v)
PEG/NaCl-Lösung	NaCl	2,5 M
	Polyethylenglycol 6000 (PEG)	20 % (w/v)
<i>Phage Dilution Buffer</i> (PDB)	EDTA	2 mM
	NaCl	20 mM
	Tris-HCl (pH 7,5)	10 mM
Trypsin-Lösung	Trypsin in PBS	1 mg/mL
Größenausschlusschromatographie		
Lagerungslösung	Ethanol	20 % (v/v)
Laufpuffer	PBS	1x
<i>In vivo</i> Maus Letalitäts (MLD) Assay		
Phosphatpuffer (pH 6,5)	Gelatine	1 % (w/v)
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	50 mM
<i>In vivo</i> Paralyse Assay		
<i>Gelatine Phosphat Buffer</i> (pH 6,5)	Gelatine	0,2 % (w/v)
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	50 mM
Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)		
5x Reaktionspuffer	5x Reaktionspuffer (Promega/New England Biolabs GmbH)	5x
dNTPs	dNTPs (Fermentas)	10 mM
MgCl <sub>2</sub>	MgCl <sub>2</sub>	50 mM
SDS-PA-Gelelektrophorese		
5x Laemmli-Puffer (mit oder ohne β-Mercaptoethanol)	(β-Mercaptoethanol)	15 % (w/v)
	Bromphenolblau	0,02 % (w/v)
	Glycerin	50 % (v/v)
	SDS	10 % (w/v)
Acrylamid-Lösung	Acrylamid	30 % (w/v)
	Bisacrylamid	0,8 % (w/v)
APS-Lösung	Ammoniumperoxodisulfat	10 % (w/v)
Laufpuffer mit SDS (pH 8,3)	Glycin	192 mM
	SDS	0,1 % (w/v)
	Tris HCl	25 mM
SDS-Lösung	Natriumlaurylsulfat (SDS)	10 % (w/v)
Tris HCl-Lösung (pH 6,8)	Tris-HCl	1 M
Tris HCl-Lösung (pH 8,8)	Tris-HCl	1,5 M

Bezeichnung	Komponente	Konzentration
<i>surface plasmon resonance spectroscopy</i> (SPR-Spektroskopie)		
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylamino-propyl)carbodiimid	0,5 M
Ethanolamin-HCl (pH 8,5)	Ethanolamin-HCl	1 M
Glycin-Lösung (pH 1,5)	Glycin	10 mM
HBS-EP Puffer	Hepes	10 mM
	NaCl	150 mM
	EDTA	3 mM
	Tween 20	0,005 % (v/v)
NaOH-Lösung	NaOH	50 mM
Natrium-Acetat-Lösung (pH 3,5-7,0)	Natrium-Acetat	10 mM
NHS	N-Hydroxysuccinimid	0,1 M
Western Blot und Immunfärbung		
Western Blot		
Laufpuffer (pH 8,3)	Glycin	192 mM
	Tris	25 mM
Methanol	Methanol	100 %
Immunfärbung (AP-konj.)		
BCIP-Lösung	5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat gelöst in Dimethylformamid	1,5 % (w/v)
Blocklösung	Milchpulver in PBS	2 % (w/v)
NPT-Lösung	Dimethylformamid	70 % (v/v)
	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid	3 % (w/v)
Immunfärbung (AP-konj.)		
Substratpuffer	MgCl <sub>2</sub>	0,5 mM
	Tris-HCl	100 mM
Immunfärbung (HRP-konj. I)		
DAB-Lösung	3,3'-Diaminobenzidin (DAB)	70 mM
Substrat-Lösung	CoCl <sub>2</sub> in PBS	0,02 % (w/v)
Wasserstoffperoxid-Lösung	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	30 % (v/v)
Immunfärbung (HRP-konj. II)		
Substrat-Lösung	2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure) Diammoniumsalz (ABTS)	0,05 % (w/v)
	Zitronensäure (pH 4,0)	50 mM
Wasserstoffperoxid-Lösung	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	30 % (v/v)

Bezeichnung	Komponente	Konzentration
Zellkultur		
NaOH	NaOH	10 M
PEI-Stammlösung	Polyethylenimin (PEI)	1 mg/mL
Trypanblau-Lösung	Trypanblau in PBS	0,4 % (w/v)

### 2.1.5 Medien und Supplemente

Sämtliche für Bakterienarbeiten verwendete Medien und Supplemente wurden mit Reinstwasser angesetzt und autoklaviert, Temperaturempfindliche Substanzen wurden hingegen sterilfiltriert und im Anschluss unter sterilen Bedingungen zugefügt. Die für die Kultivierung von Mammaliazellen benötigten Medien und Supplemente wurden entweder steril von den Firmen Biochrom GmbH (Berlin), GE Healthcare (München), Life Technologies (Darmstadt) geliefert oder mit Reinstwasser angesetzt, autoklaviert beziehungsweise sterilfiltriert.

**Tabelle 2.5: Verwendete Medien und Supplemente**

Bezeichnung	Komponente	Konzentration
2x YT-Agar	Bacto-Agar in 2x YT-Medium	1,5 % (w/v)
2x YT-Medium	Bacto-Hefeextrakt	1 % (w/v)
	Bacto-Trypton	1,6 % (w/v)
	NaCl	0,05 % (w/v)
Ampicillin-Stammlösung	Ampicillin	100 mg/mL
Carbenicillin-Stammlösung	Carbenicillin	50 mg/mL
F17-Medium	FreeStyle F17 Expressionsmedium	1x
	L-Glutamin	7,5 mM
	Pluronic F-68	0,1 % (v/v)
G418-Stammlösung	Geneticin (G418)	50 mg/mL
Glukose-Stammlösung	Glukose	2 M
IPTG-Stammlösung	IPTG	1 M
Kanamycin-Stammlösung	Kanamycin	50 mg/mL
L-Glutamin-Stammlösung	L-Glutamin	200 mM
Pluronic-F68-Stammlösung	Pluronic-F68	10 % (w/v)
SOC-Medium (pH 7,0)	Bacto-Hefeextrakt	0,5 % (w/v)
	Bacto-Trypton	2 % (w/v)
	Glukose	20 mM
	MgCl <sub>2</sub>	20 mM
	NaCl	85 mM

Bezeichnung	Komponente	Konzentration
Tetracyclin-Stammlösung	Tetracyclin	20 mg/mL
Trypton N1 (TN1)	Trypton N1	20 % (w/v)

### 2.1.6 Bakteriophagen, Mikroorganismen, Zelllinien, Organismen

**Tabelle 2.6: Verwendete Bakteriophage, Mikroorganismen, Mammaliazelllinien und Organismen**

Bezeichnung	Genotyp/Eigenschaften	Referenz
Bakteriophage		
Hyperphage	Deletion pIII	Progen Biotechnik (Rondot <i>et al.</i> , 2001)
M13K07	–	Life Technologies (Vieira & Messing, 1987)
Mikroorganismen		
<i>E. coli</i> SURE strain	endA1 glnV44 thi-1 gyrA96 relA1 lac recB recJ sbcC umuC::Tn5 uvrC e14- Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)171 F'[ proAB <sup>+</sup> lacI <sup>q</sup> lacZΔM15 Tn10]	Stratagene, LA Jolla
<i>E. coli</i> XL1-Blue MRF'	Δ(mcrA)183 Δ(mcrCB -hsdSMRmrr) 173 endA1 supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA46 thi relA1lac-F' [proAB + lacq ZDM15 TN10(tetR)]	Stratagene, LA Jolla
Mammaliazelllinien		
HEK293-6E	Humane embryonale Nierenzellen, Suspensionszelllinie, Expression von Epstein-Barr-Virus-Nukleares-Antigen 1	NRC Biotechnology Research Institute, Montreal
Organismen		
BALB/c Maus	Inzuchtlinie	Harlan, Bicester
<i>Macaca fascicularis</i>	–	CRSSA, La Troche
Swiss Maus	Inzuchtlinie	Charles River Laboratories (Frankreich)

### 2.1.7 Plasmide

**Tabelle 2.7: Verwendete Plasmide**

Plasmid	Verwendungszweck
pCSE2.5-hlgG1-Fc-XP	Produktion von scFv-Fc-Antikörper mit humanen Fc-Teil
pCSE2.5-mlgG2c-Fc-XP	Produktion von scFv-Fc-Antikörper mit murinen Fc-Teil
pCSH1c	Produktion der schweren Kette von humanen IgG1
pCSL3k	Produktion der leichten Kette (kappa) von humanen IgG
pCSL3l	Produktion der leichten Kette (lambda) von humanen IgG

Plasmid	Verwendungszweck
pGEM®-T	Vektor für Klonierungsarbeiten, Generierung von Antikörpergenbibliotheken
pHAL14	Phagemid-Vektor, Generierung von pHAL32
pHAL32	Phagemid-Vektor, Generierung von Antikörpergenbibliotheken

## 2.1.8 Oligonukleotide

**Tabelle 2.8: Verwendete Oligonukleotide**

Oligonukleotide	Sequenz (5'-3')	Verwendungszweck
Allgemeine Oligonukleotide		
CM2_for	CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG	Amplifikation scFv-Fc, Sequenzierung
MHLacZ-Pro_f	GGCTCGTATGTTGTGTGG	Amplifikation scFv, Sequenzierung
MHgIII_r	CTAAAGTTTTGTCTCTTTCC	Amplifikation scFv, Sequenzierung
Tor-pCMV-mIgG01-Fc-seq-f	CACTTTGCCTTTCTCTCC	Amplifikation scFv-Fc, Sequenzierung
Tor-pCMV-mIgG01-Fc-seq-r	CAGATGGCTGGCAACTAG	Amplifikation scFv-Fc, Sequenzierung
JLseq-Hcmv1_f	CTAACTAGAGAACCCACTGC	Amplifikation IgG, Sequenzierung
MHBGH_r	TAGAAGGCACAGTCGAGG	Amplifikation IgG, Sequenzierung
Generierung von pHAL32		
MHColE1_f	CCCAATACGCAAACCGCC	Einfügen einer <i>Sfi</i> -Restriktionsschnittstelle in pHAL14
MhpeI <sub>BS</sub> <i>Sfi</i> -HindIII_r	GCTGGCGGCCCAGCCGGCCATGG CCTAATTAATTAAGCTTGAAG	Einfügen einer <i>Sfi</i> -Restriktionsschnittstelle in pHAL14
Oligonukleotide für die Generierung von Antikörpergenbibliotheken		
MHMacVH_f1	SAGGTGCAGCTGGTGSAGTCTGGG	1. PCR, Amplifikation der schweren Kette von IgG aus <i>M. fascicularis</i>
MHMacVH_f2	CAGGTGCAGCTRCTCGAGTCKGG	1. PCR, Amplifikation der schweren Kette von IgG aus <i>M. fascicularis</i>
MHMacVH_f3	SAGGTGCAGCTGCTCGAGTCKGG	1. PCR, Amplifikation der schweren Kette von IgG aus <i>M. fascicularis</i>
MHMacVH_f4	CAGGTACAGCTCGAGCAGTCAGG	1. PCR, Amplifikation der schweren Kette von IgG aus <i>M. fascicularis</i>
MHMacVH_f5	GAGGTGCAGCTGCTCGAGTCTGG	1. PCR, Amplifikation der schweren Kette von IgG aus <i>M. fascicularis</i>
MHMacVH_f6	CAGGTGCAGCTRCTCGAGTSGGG	1. PCR, Amplifikation der schweren Kette von IgG aus <i>M. fascicularis</i>
MHMacIgGCH1scFv_r	GTCCTCGCATGGGCCCTTGGTGA	1. PCR, Amplifikation der schweren Kette von IgG aus <i>M. fascicularis</i>

Oligonukleotide	Sequenz (5'-3')	Verwendungszweck
Oligonukleotide für die Generierung von Antikörpergenbibliotheken		
MacVL1	GACATCGAGCTCACCCAGTCTCCA	1. PCR, Amplifikation der leichten Kette (lambda) von IgG aus <i>M. fascicularis</i>
MacVL2	GACATCGAGCTCACCCAGTCTCC	1. PCR, Amplifikation der leichten Kette (lambda) von IgG aus <i>M. fascicularis</i>
MacVL3	GATATTGAGCTCACTCAGTCTCCA	1. PCR, Amplifikation der leichten Kette (lambda) von IgG aus <i>M. fascicularis</i>
MacVL4	GAAATTGAGCTCACGCAGTCTCCA	1. PCR, Amplifikation der leichten Kette (lambda) von IgG aus <i>M. fascicularis</i>
MacVL5	GAAATTGAGCTCACACAGTCTCCA	1. PCR, Amplifikation der leichten Kette (lambda) von IgG aus <i>M. fascicularis</i>
MacVL6	GAGCCGCACGAGCCCGAGTCCA GATGACCCAGTCTCC	1. PCR, Amplifikation der leichten Kette (lambda) von IgG aus <i>M. fascicularis</i>
Oligonukleotide für die Generierung von Antikörpergenbibliotheken		
MacVL7	GAGCCGCACGAGCCCGAGTCTCGT GATGACACAGTCTCC	1. PCR, Amplifikation der leichten Kette (lambda) von IgG aus <i>M. fascicularis</i>
MacCL	GCGCCGTCTAGAATTAACACTCTCC CCTGTTGAAGCTCTTTGTGACGGG CGAACTCAG	1. PCR, Amplifikation der leichten Kette (lambda) von IgG aus <i>M. fascicularis</i>
MHMacVH-Sfil_f1	CGCGTGGCCCAGCCGGCCATGGC CSAGGTGCAGCTGGTGSAGTCTGG G	2. PCR, Amplifikation der schweren Kette von IgG aus <i>M. fascicularis</i>
MHMacVH-Sfil_f2	CGCGTGGCCCAGCCGGCCATGGC CCAGGTGCAGCTRCTCGAGTCKGG	2. PCR, Amplifikation der schweren Kette von IgG aus <i>M. fascicularis</i>
MHMacVH-Sfil_f3	CGCGTGGCCCAGCCGGCCATGGC CSAGGTGCAGCTGCTCGAGTCKGG	2. PCR, Amplifikation der schweren Kette von IgG aus <i>M. fascicularis</i>
MHMacVH-Sfil_f4	CGCGTGGCCCAGCCGGCCATGGC CCAGGTACAGCTCGAGCAGTCAGG	2. PCR, Amplifikation der schweren Kette von IgG aus <i>M. fascicularis</i>
MHMacVH-Sfil_f5	CGCGTGGCCCAGCCGGCCATGGC CGAGGTGCAGCTGCTCGAGTCTGG	2. PCR, Amplifikation der schweren Kette von IgG aus <i>M. fascicularis</i>
MHMacVH-Sfil_f6	CGCGTGGCCCAGCCGGCCATGGC CCAGGTGCAGCTRCTCGAGTSGGG	2. PCR, Amplifikation der schweren Kette von IgG aus <i>M. fascicularis</i>
MHMacIgGCH1scFv-HindIII_r	GTCCTCGCAAAGCTTTGGGCCCTT GGTGA	2. PCR, Amplifikation der schweren Kette von IgG aus <i>M. fascicularis</i>
MHMacVK-MluI_f1	ACCGCCTCCACGCGTAGAHATC GAGCTCACNCAGTCTCC	2. PCR, Amplifikation der leichten Kette (lambda) von IgG aus <i>M. fascicularis</i>
MHMacVK-MluI_f6	ACCGCCTCCACGCGTAGAGTCCW GATGACMCAGTCTCC	2. PCR, Amplifikation der leichten Kette (lambda) von IgG aus <i>M. fascicularis</i>

## Material und Methoden

Oligonukleotide	Sequenz (5'-3')	Verwendungszweck
Oligonukleotide für die Generierung von Antikörpergenbibliotheken		
MHMacKappaCL-NotI_r	ACCGCCTCCGCGGCCGCGACAGAT GGTGSAGCCAC	2. PCR, Amplifikation der leichten Kette (lambda) von IgG aus <i>M. fascicularis</i>
Oligonukleotide für gezielte Aminosäureaustausche in SEM120-IIIC1		
SEM120IIIC1-VH2_L20V_f	TCAGTGAAGGTGTCCTGCAA	Aminosäureaustausch in der schweren Kette von SEM120-IIIC1
SEM120IIIC1-VH2_L20V_r	TTGCAGGACACCTTCACTGA	Aminosäureaustausch in der schweren Kette von SEM120-IIIC1
SEM3_VH3_V5E_f	GCCCAGGTGCAGCTGGAACAGTCT GGCGCCGAAGTG	Aminosäureaustausch in der schweren Kette von SEM120-IIIC1
SEM3_VH3_V5E_r	CACTTCGGCGCCAGACTGTTCCAG CTGCACCTGGGC	Aminosäureaustausch in der schweren Kette von SEM120-IIIC1
SEM3-VH3_H35T_f	TTCACCAACTACTACATGCACTGGG TGCGCCAGGCC	Aminosäureaustausch in der schweren Kette von SEM120-IIIC1
SEM3-VH3_H35T_r	GGCCTGGCGCACCCAGTGCATGTA GTAGTTGGTGAA	Aminosäureaustausch in der schweren Kette von SEM120-IIIC1
SEM3-VH3_I50W_f	CTGGAATGGATGGGCTGGATCAAC CCCAGCAACGGC	Aminosäureaustausch in der schweren Kette von SEM120-IIIC1
SEM3-VH3_I50W_r	GCCGTTGCTGGGGTTGATCCAGCC CATCCATTCCAG	Aminosäureaustausch in der schweren Kette von SEM120-IIIC1
SEM3-VH3_Y80F_f	AGCACCTCCACCGTGTTCATGGAA CTGAACAGCCTG	Aminosäureaustausch in der schweren Kette von SEM120-IIIC1
SEM3-VH3_Y80F_r	CAGGCTGTTCAAGTTCCATGAACACG GTGGAGGTGCT	Aminosäureaustausch in der schweren Kette von SEM120-IIIC1
Oligonukleotide für IgG-Antikörper		
SEM131.1_for	AAGGCGCGCACTCCCAGGTACAGC TCGAGCAGTCAGGGGC	Konvertierung der SEM120-IIIC1 Varianten ins IgG-Format
SEM131.2_rev	AAGCTAGCTGAGGAGACGGTGACC AGGACTCCCTGGCCCC	Konvertierung der SEM120-IIIC1 Varianten ins IgG-Format
SEM131.3_for	AAACCGGTGAGCTCCAGATGACAC AGTCTCCATCTGCCTT	Konvertierung der SEM120-IIIC1 Varianten ins IgG-Format
SEM131.4_rev	AACGTACGTTTGATGTCCAGTTTGG TCCCGGGGCCGAAAG	Konvertierung der SEM120-IIIC1 Varianten ins IgG-Format
SEM131.5_for	AAGGCGCGCACTCCCAGGTGCAGC TGGAACAGTCTGGCGC	Konvertierung der SEM120-IIIC1 Varianten ins IgG-Format
SEM131.6_rev	AAGCTAGCGCTAGACACGGTCACG AGCACGCCCTGGCCCC	Konvertierung der SEM120-IIIC1 Varianten ins IgG-Format
SEM131.7_for	AAACCGGTGACATCCAGATGACCC AGAGCCCCAGCAGCCTG	Konvertierung der SEM120-IIIC1 Varianten ins IgG-Format
SEM131.8_rev	AACGTACGCTTGATGTCCACCTTGG TGCCAGGGCCGAAGG	Konvertierung der SEM120-IIIC1 Varianten ins IgG-Format
SEM238.1_for	AAGGCGCGCACTCCCAGGTGCAGC TGCTCGAGTCGGGCC	Konvertierung von SEM120-IID5 ins IgG-Format



Oligonukleotide	Sequenz (5'-3')	Verwendungszweck
Oligonukleotide für IgG-Antikörper		
SEM238.2_rev	AAGCTAGCTGAGGAGACGGTGACC AGGACTCCCTGGCCCC	Konvertierung von SEM120-IID5 ins IgG-Format
SEM238.3_for	AAACCGGTGAGCTCCAGATGACCC AGTCTCCATCTGCCTT	Konvertierung von SEM120-IID5 ins IgG-Format
SEM238.4_rev	AACGTACGTTTGATTTCCACCTTGG TCCCTTGGCCGAACG	Konvertierung von SEM120-IID5 ins IgG-Format

## 2.1.9 Enzyme und zugehörige Puffer

**Tabelle 2.9** Verwendete Enzyme und zugehörige Puffer/Supplemente

Enzyme, Puffer und Supplemente	Hersteller
Alkalische Phosphatase, Calf Intestinal (CIP)	New England BioLabs (NEB), Frankfurt
BSA (100x)	New England BioLabs (NEB), Frankfurt
GoTaq Flexi DNA-Polymerase	Promega, Mannheim
GoTaq-Reaktionspuffer Flexi (5x)	Promega, Mannheim
NEB Reaktionspuffer 1-4 (10x)	New England BioLabs (NEB), Frankfurt
NEB Restriktionsenzyme <i>AgeI</i> , <i>BsNI</i> , <i>BssHII</i> , <i>DraIII</i> , <i>HindIII</i> , <i>MluI</i> , <i>NcoI</i> , <i>NheI</i> , <i>NotI</i> , <i>SfiI</i> ,	New England BioLabs (NEB), Frankfurt
Phusion DNA-Polymerase	Finnzymes, Keilaranta
Phusion-Reaktionspuffer HF (5x)	Finnzymes, Keilaranta
T4 DNA-Ligase	Promega, Mannheim
T4 DNA-Ligase-Puffer (10x)	Promega, Mannheim
Trypsin	Sigma-Aldrich, München

## 2.1.10 Kommerziell verfügbare Antikörper

**Tabelle 2.10:** Verwendete kommerziell verfügbare Antikörper

Antikörper	Bezeichnung	Verwendete Konzentration		Hersteller
		ELISA	Immunfärbung	
Kaninchen anti-SNAP-25 (AA190-197)	–	1:1500	–	NIBSC, Potters Bar
Maus[10C3] anti-pIII	PSKAN3	–	1:2000	MoBiTec, Berlin
Maus anti-C-Myc- <i>tag</i>	9E10/21	1:2000	1:1000	AG Dübel, Braunschweig
Maus[B62-FE2] anti-M13	61097	1:1000	–	Progen, Heidelberg
Ziege anti-Human IgG (Fc-spezif.), AP-konj.	109-135-098	–	1:10.000	Dianova, Hamburg

Antikörper	Bezeichnung	Verwendete Konzentration		Hersteller
		ELISA	Immunfärbung	
Ziege anti-Human IgG (Fc-spezif.), HRP-konj.	A0170	1:70.000	1:50.000	Sigma-Aldrich, München
Ziege anti-Human IgG (polyvalent)	I1761	1:6500	–	Sigma-Aldrich, München
Ziege anti-Kaninchen IgG, HRP-konj.	A0545	1:2000	–	Sigma-Aldrich, München
Ziege anti-Maus IgG (Fab-spezif.), AP-konj.	A2179	–	1:5000	Sigma-Aldrich, München
Ziege anti-Maus IgG (Fc-spezif.), AP-konj.	A2429	–	1:10.000	Sigma-Aldrich, München
Ziege anti-Maus IgG (Fc-spezif.), HRP-konj.	A0168	1:50.000	1:20.000	Sigma-Aldrich, München

### 2.1.11 Software und Datenbanken

**Tabelle 2.11: Verwendete Software und Datenbanken**

Bezeichnung	Anwendung	Referenz
BIAevaluation 4.1	Auswertung der SPR-Analysen	Biacore
Chimera	Visualisierung und Analyse von Proteinstrukturen	<a href="https://www.cgl.ucsf.edu/chimera/">https://www.cgl.ucsf.edu/chimera/</a>
Geneious 4.8.5	Sequenzanalysen	<a href="http://www.geneious.com">http://www.geneious.com</a>
Gimp 2.8	Bildbearbeitung	<a href="http://www.gimp.org">http://www.gimp.org</a>
Image Lab 4.0.1	Analyse von Gelbildern	Bio-Rad
IMGT	Analyse von Antikörpersequenzen	<a href="http://www.imgt.org">http://www.imgt.org</a>
LibreOffice 4.2.4	Office-Anwendungen	<a href="https://de.libreoffice.org">https://de.libreoffice.org</a>
NCBI	Datenbank für Gen- und Proteinsequenzen; Literaturdatenbank	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov">http://www.ncbi.nlm.nih.gov</a>
Prism 6	Graphische Datenaufbereitung	GraphPad Software
Unicorn 5.10	Auswertung von Chromatogrammen	GE Healthcare
VBASE2-Datenbank	Analyse von Antikörpersequenzen	(Retter <i>et al.</i> , 2005)
WAM (Web Antibody Modelling)	Modellierung der 3D Struktur von Antikörpern	<a href="http://antibody.bath.ac.uk">http://antibody.bath.ac.uk</a>
Zotero	Literaturverwaltung	<a href="https://www.zotero.org">https://www.zotero.org</a>

## 2.1.12 Sonstiges

**Tabelle 2.12: Zusätzliche Materialien**

Bezeichnung	Hersteller
6x DNA-Massenstandard GeneRuler™ 1kB Plus	Fermentas, St Leon-Rot
Human N Protein Standard SL	Siemens Healthcare, Eschborn
Kit for Molecular Weights 12.000-200.000	Sigma-Aldrich, München
Low Molecular Weight DNA Ladder	New England BioLabs (NEB), Frankfurt
Precision Plus Protein™ All Blue Standards	Bio-Rad, München
Precision Plus Protein™ Unstained Standards	Bio-Rad, München

## 2.2 Mikrobiologische Methoden

### 2.2.1 Sterilisation

Sämtliche für das sterile Arbeiten benötigten Materialien, wie Medien, Lösungen und Behältnisse wurden für 20 min bei 121 °C autoklaviert. Temperaturempfindliche Substanzen, welche nicht autoklaviert werden konnten, wurden bei einer Porengröße von 0,2 µm sterilfiltriert.

### 2.2.2 Lagerung von *E. coli*-Zellen

Flüssigkulturen wurden je nach ihrer Zelldichte 1-2 Wochen bei 4 °C gelagert. Bei einer Kultivierung von *E. coli* auf 2xYT-Agarplatten wurden diese zwischen 1 und 2 Monate bei 4 °C aufbewahrt. Für eine längerfristige Lagerung wurden Glycerinstocks verwendet. Hierzu wurde in einem verschließbaren Mikroschraubröhrchen eine gut bewachsene Flüssigkultur mit 20 % (v/v) Glycerin versetzt und in flüssigen Stickstoff eingefroren. Die Lagerung der Glycinstocks erfolgte bei -80 °C.

### 2.2.3 Herstellung von kompetenten *E. coli*-Zellen

Die effektive Aufnahme von DNA in *E. coli* erfordert die Verwendung von kompetenten Zellen, bei denen die Zellmembran für die DNA-Aufnahme permeabilisiert wurde. Für die Transformation von DNA-Konstrukten wurden chemo- beziehungsweise elektrokompente XL1-Blue MRF' Zellen hergestellt und verwendet.

#### **2.2.3.1 Herstellung von chemokompetenten *E. coli*-Zellen**

Für die Herstellung chemokompetenter XL1-Blue MRF' Zellen wurden 100 mL 2xYT-Medium (20 µg/mL Tetracyclin) mit einer zuvor angesetzten Übernachtskultur auf eine  $OD_{600} < 0,1$  inokuliert und bei 37 °C sowie 250 rpm bis zu einer  $OD_{600}$  von 0,5 inkubiert. Anschließend wurde die Kultur für 5 min bei 4 °C und 3220 x g zentrifugiert, das Zellpellet in 15 mL eiskaltem TFB1 vorsichtig resuspendiert und für 90 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation für 5 min bei 4 °C und 3220 x g wurde das Zellpellet in 4 mL eiskaltem TFB2 resuspendiert. Die Zellsuspension wurde a 50-200 µL aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

#### **2.2.3.2 Herstellung von elektrokompenten *E. coli*-Zellen**

Für die Herstellung von elektrokompenten *E. coli*-Zellen wurden 200 mL 2xYT-Medium (20 µg/mL Tetracyclin) mit einer XL1-Blue MRF' Übernachtskultur auf eine  $OD_{600} < 0,1$  inokuliert und bei 37 °C sowie 250 rpm bis zu einer  $OD_{600}$  von 0,5 inkubiert. Anschließend wurde die Kultur in zwei Zentrifugenbehälter überführt und für 10 min auf Eis inkubiert. Nach 10 minütiger Zentrifugation bei 4 °C und 3220 x g wurde das Zellpellet in 100 mL dH<sub>2</sub>O resuspendiert und erneut 15 min bei 4 °C und 3220 x g zentrifugiert. Dieser Schritt wurde ein weiteres mal wiederholt, anschließend das Pellet in 50 mL eiskalter Glycerinlösung (10 % (v/v)) resuspendiert und in 50 mL Polypropylen-Röhrchen für 10 min bei 4 °C und 3220 x g zentrifugiert. Im Anschluss wurde das Pellet in 1 mL Glycerinlösung (10 % (v/v)) resuspendiert und zu je 50 µL aliquotiert. Die Aliquots wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur späteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

#### **2.2.4 Transformation von chemokompetenten *E. coli*-Zellen mittels Hitzeschock**

Für die Transformation chemokompetenter *E. coli*-Zellen wurden diese zunächst auf Eis aufgetaut. Anschließend wurden jeweils 50 µL der kompetenten Zellen mit dem vollständigem Ligationsansatz beziehungsweise 20-100 ng Plasmid-DNA gemischt und für 20 min auf Eis inkubiert. Daraufhin erfolgte ein Hitzeschock für 1 min bei 42 °C, gefolgt von einer weiteren Inkubation auf Eis für 2 min. Anschließend wurden 950 µL SOC-Medium hinzugefügt und der Ansatz für 1 h bei 37 °C und 600 rpm im Eppendorf Thermomixer inkubiert. Vom Transformationsansatz wurden 50-350 µL auf Selektionsplatten ausgestrichen und bei 37 °C für 12-16 h inkubiert.

### 2.2.5 Transformation von elektrokompetenten *E. coli*-Zellen mittels Elektroporation

Für die Elektroporation wurden elektrokompetente XL1-Blue MRF' Zellen auf Eis aufgetaut und jeweils 25 µL mit dem Ligationsansatz beziehungsweise der Plasmid-DNA vereint. Nach 1-5 minütiger Inkubation auf Eis wurde der Transformationsansatz in eine vorgekühlte 0,1 cm Elektroporationsküvette pipettiert und in den Mikropulser gestellt. Nach Elektroporation mit dem Programm „Ec1“ (1,7 kV) wurden 0,5 mL auf 37 °C vorgewärmtes SOC-Medium zum Ansatz pipettiert und in ein steriles auf 37 °C vorgewärmtes Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, bevor der Ansatz für 1 h bei 37 °C und 600 rpm im Eppendorf Thermomixer inkubiert wurde. Im Anschluss wurden der Transformationsansatz auf Selektionsplatten ausgestrichen und für weitere 12-16 h bei 37 °C inkubiert.

### 2.2.6 Generierung einer Immun-Antikörpergenbibliothek aus *Macaca fascicularis*

Für die Generierung der Antikörpergenbibliothek gegen Botulinum Neurotoxin Serotyp A wurde ein männlicher Makake (*Macaca fascicularis*) mit 4 subkutanen Injektionen immunisiert. Für jeder Injektion wurden 80 µg rekombinant erzeugte leichten Kette von Botulinum Neurotoxin A1 (BoNT/A1-L, Metabionics Inc., Madison, USA) verwendet. Die ersten 3 Injektionen wurden in einem zeitlichen Abstand von je einem Monat durchgeführt, die vierte Injektion erfolgte nach weiteren 8 Monaten. Für die Isolierung der RNA mittels Tri Reagent® (Molecular Research Center Inc., Cincinnati, USA) wurde eine Knochenmarkprobe entnommen und für die cDNA-Synthese verwendet. Für die darauffolgenden DNA-Amplifikation der  $\kappa$  leichten Kette wurden 7 Oligonukleotide sowie 9 Oligonukleotide für die Amplifikation der für das Fd Fragment kodierenden DNA der  $\gamma$  Kette verwendet. Anschließend wurden je die PCR-Produkte der leichten und schweren Kette vereinigt und in den pGEM®-T Vektor (Promega) kloniert. Die im pGEM®-T Vektor vorliegenden Antikörpersequenzen wurde anschließend mit spezifischen Oligonukleotiden, welche die Schnittstellen für die Klonierung der finalen Antikörpergenbibliothek in den pHAL32 Vektor beinhalten, amplifiziert. Dieser Vektor basiert auf pHAL14 (Hust *et al.*, 2011) und wurde speziell für die Antikörpergenbibliothek erstellt. Zunächst wurde das Amplifikat der leichten Kette über die Restriktionsschnittstellen *MluI* und *NotI* in pHAL32 kloniert. In einem zweiten Klonierungsschritt wurden die für die schwere Kette kodierende DNA-Sequenzen mittels den Restriktionsschnittstellen *SfiI* und *HindIII* in pHAL32, mit dem zuvor integrierten Repertoire der leichten Kette, kloniert. Die Effizienz der jeweiligen Klonierung wurde mittels Kolonie-PCR überprüft und der Anteil vollständiger scFv-Sequenzen in den Subbibliotheken ermittelt. Jede Subbibliothek mit dem Repertoire der leichten und schweren Kette wurde mit 20 % Glycerin (v/v) versetzt und bei -80 °C

gelagert beziehungsweise für die Verpackung von scFv-Phagen mittels M13K07 und Hyperphage verwendet.

### 2.2.7 Generierung einer scFv-Phagenbibliothek

Für die Selektion von scFv-präsentierenden Phagen aus einer Antikörpergenbibliothek wurde diese zunächst mittels Hyperphage und M13K07 verpackt. Hierzu wurden 400 mL 2x YT-Medium (100 µg/mL Ampicillin, 0,1 M Glucose) mit der vereinigten Antikörpergenbibliothek in *E. coli* auf eine OD<sub>600</sub> von 0,05 inokuliert und bei 37 °C sowie 250 rpm bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 inkubiert. Anschließend erfolgte die Infektion von 25 mL *E. coli*-Kultur (etwa  $1,25 \times 10^{10}$  Bakterien) mit  $2,5 \times 10^{10}$  cfu Helferphagen (M13K07 oder Hyperphage) für 30 min bei 37 °C ohne Schütteln und weitere 30 min bei 37 °C und 250 rpm. Im Anschluss an die Inkubation folgte eine 10 minütige Zentrifugation bei 3220 x g. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 400 mL 2x YT-Medium (100 µg/mL Ampicillin, 50 µg/mL Kanamycin) aufgenommen. Die Produktion von scFv-Phagen erfolgte für 20 h bei 30 °C und 250 rpm. Nach 30 minütiger Zentrifugation bei 10.000 x g wurde der Produktionsüberstand mit 1/5 Volumen 20 % (w/v) PEG und 2,5 M NaCl versetzt und für 1 h bei 4 °C unter stetigem Schütteln inkubiert. Nach einer weiteren Zentrifugation für 10 min bei 10.000 x g und 4 °C wurde das Phagenpellet in 10 mL PDB (*Phage Dilution Buffer*) aufgenommen, filtriert (0,45 µm) und mit 1/5 Volumen 20 % (w/v) PEG und 2,5 M NaCl versetzt. Es folgte eine 30 minütige Inkubation bei 4 °C und anschließende Zentrifugation bei 4 °C und 18.000 x g. Das Phagenpellet wurde in 1 mL PDB aufgenommen und restliche *E. coli* bei 16.000 x g für 1 min pelletiert. Der Phagenüberstand wurde bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert.

### 2.2.8 Selektion von scFv-präsentierenden Phagen aus einer Antikörpergenbibliothek (*panning*)

Für die Selektion spezifischer scFv gegen Botulinum Neurotoxin wurde die Kavität einer Mikrotiterplatte (Nunc Maxisorp®, Roskilde) mit rekombinanten BoNT/A1-L beziehungsweise Holotoxin BoNT/A1 (MetabioLogics, Madison, USA) mit einer Konzentration von 20 µg/mL in PBS bei 4 °C über Nacht beschichtet. Am darauffolgenden Tag wurde die Kavität mit 3 % BSA in TBS für 2 h bei 37 °C geblockt und nach einem anschließendem Waschschriff mit der Antikörpergenbibliothek für 2 h bei 37 °C inkubiert. Zur Kompetition von unspezifisch bindenden scFv-Phagen wurde die Antikörpergenbibliothek zuvor mit BSA und Milchpulver präinkubiert. Während der ersten Selektionsrunde wurde die Kavität nach Inkubation der Antikörpergenbibliothek 10 mal mit TBS (0,1 % (v/v) Tween 20) im Intervall von 5 min gewaschen. Nach einem weiteren

Waschschrift mit sterilem TBS erfolgte die Elution von gebundenen scFv-Phagen mit 45 µL Trypsin (10 mg/mL in TBS) für 30 min bei 37 °C. Die eluierten Phagen wurden für die Infektion von *E. coli*-Zellen (SURE *strain*, Stratagene), kultiviert in SB-Medium (10 µg/mL Tetracyclin, 50 µg/mL Carbenicillin), verwendet. Für die Produktion neuer scFv-Phagen wurden die zuvor infizierten *E. coli* mit dem Helferphagen M13K07 koinfiziert und über Nacht bei 30 °C in SB-Medium (10 µg/mL Tetracyclin, 50 µg/mL Carbenicillin und 70 µg/mL Kanamycin) kultiviert. Am darauffolgendem Tag wurden die scFv-Phagen mittels PEG/NaCl (4 % (w/v) PEG-8000, 3 % (w/v) NaCl) präzipitiert und für eine weitere Selektionsrunde verwendet. Insgesamt wurden 3 Selektionsrunden wie zuvor beschrieben durchgeführt, jedoch stieg die Anzahl der Waschschriffe mit jeder weiteren Selektionsrunde. Während der zweiten Selektionsrunde wurde die Kavität 20 beziehungsweise während der Dritten 30 mal mit TBS (0,1 % (v/v) Tween 20) gewaschen. Die infizierten *E. coli* der dritten Runde wurden auf Selektionsplatten (50 µg/mL Carbenicillin) kultiviert und für das folgende *screening* verwendet.

### 2.2.9 Titerbestimmung von scFv-Phagen

Der Titer infektiöser Phagenpartikel wurden nach Infektion einer XL1-Blue MRF' Kultur über die *colony forming units* (cfu) bestimmt. Hierzu wurde mit sterilem PBS eine Verdünnungsreihe der Phagenlösung angesetzt und je 10 µL mit 50 µL einer *E. coli* Kultur in 2xYT-Medium für 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach Infektion der *E. coli*-Zellen wurden der Ansatz auf Selektionsplatten (100 µg/mL Ampicillin) ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Über die Anzahl der gewachsenen Kolonien und der jeweiligen Verdünnungsstufe wurden die cfu/mL beziehungsweise cfu berechnet.

### 2.2.10 Produktion löslicher scFv-Antikörper in Mikrotiterplatten

Im Anschluss an die Selektion von scFv-präsentierenden Phagen folgte das sogenannte *screening* löslicher scFv mittels monoklonalem Antigen-ELISA. Zunächst wurden von den Selektionsplatten einzelne Kolonien in die Kavitäten einer Polypropylen Mikrotiterplatte mit 150 µL 2x YT-Medium (100 µg/mL Ampicillin, 0,1 M Glukose) überführt und über Nacht bei 37 °C und 800 rpm inkubiert. Am darauffolgendem Tag wurde eine neue mit 150 µL 2x YT-Medium (100 µg/mL Ampicillin, 0,1 M Glukose) gefüllte Polypropylen Mikrotiterplatte mit 10 µL der Übernachtskultur inokuliert und für 2 h bei 37 °C und 800 rpm kultiviert. Nach einem 10 minütigem Zentrifugationsschritt bei 3220 x g wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 150 µL 2x YT-Medium (100 µg/mL Ampicillin, 50 µM IPTG) aufgenommen. Die Produktion löslicher scFv-Antikörper erfolgte über Nacht bei

30 °C und 800 rpm. Im Anschluss folgte ein weiterer 10 minütiger Zentrifugationsschritt bei 3220 x g. Der Produktionsüberstand wurde abgenommen und für weitere Analyse verwendet.

## 2.3 Molekularbiologische Methoden

### 2.3.1 Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels der Polymerase Ketten Reaktion (PCR)

In Rahmen dieser Arbeit wurde sowohl auf das Verfahren einer präparativen wie auch analytischen PCR zurückgegriffen. Die präparative PCR diente der Amplifikation von DNA-Sequenzen für die Klonierung in unterschiedliche Vektoren. Durch entsprechende Oligonukleotide (*primer*) war es möglich Restriktionsschnittstellen beziehungsweise Aminosäureaustausche einzubauen. Hingegen wurde die analytische PCR als Nachweismethode für die Integration einer spezifischen DNA-Sequenz in einen Vektor verwendet. Hierzu wurde im Anschluss einer Transformation von kompetenten *E. coli*-Zellen von den Selektionsplatten Einzelkolonie für einen PCR-Ansatz genutzt. Die Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes und des dazugehörigem PCR-Programms wird im Folgendem an einem Beispiel beschrieben.

**Tabelle 2.13: Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes für die Phusion- beziehungsweise GoTaq-Polymerase**

Komponente	Phusion	GoTaq
DNA Matrize	2-10 ng	2-10 ng (Einzelkolonie)
5x Reaktionspuffer	2 µL	2 µL
MgCl <sub>2</sub>	–	1 mM
dNTPs (10 mM)	0,2 µL	0,2 µL
<i>forward primer</i> (10 µM)	0,5 µL	0,5 µL
<i>reverse primer</i> (10 µM)	0,5 µL	0,5 µL
Polymerase	1-2 U	1-2 U
dH <sub>2</sub> O	Gesamtvolumen 10 µL	



**Tabelle 2.14: PCR-Programm für die Amplifikation von DNA-Sequenzen**

Programm	Temperatur [°C]	Zeit [min]
Initiale Denaturierung	95	10
Denaturierung	95	1
Annealing	variabel*	1
Elongation	72	variabel**
Ende	72	10
Abkühlen	16	∞

} 20x

\* Abhängig von den verwendeten Oligonukleotiden

\*\* Abhängig von der verwendeten Polymerase sowie Länge der zu amplifizierenden DNA-Sequenz

### 2.3.2 Präparation von Plasmid-DNA

Für die Plasmid-Präparation aus *E. coli*-Zellen wurden kommerziell erhältliche Kit-Systeme verwendet. Hierbei handelte es sich um das peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I von PEQLAB und dem NucleoSpin-Plasmid Kit beziehungsweise NucleoBond® Xtra Midi Kit von Macherey und Nagel. Die jeweiligen Kit-Systeme wurden nach Herstellerangaben verwendet. Die DNA wurde in 20-50 µL Elutionspuffer beziehungsweise dH<sub>2</sub>O eluiert und anschließend für 10 min bei 65 °C inkubiert um mögliche DNasen zu denaturieren. Die Lagerung der Plasmid-DNA erfolgte bei -20 °C.

### 2.3.3 Präzipitation von DNA mittels Ethanol-Fällung

Für die Aufkonzentrierung beziehungsweise Reinigung von DNA-Lösungen wurde eine Präzipitation mittels Ethanol und Natriumacetat durchgeführt. Hierzu wurde die DNA-Lösung mit dH<sub>2</sub>O auf 100 µL aufgefüllt und mit 10 µL 3 M Natriumacetat sowie 250 µL Ethanol (99,8 %, *p.a.*) versetzt. Nach 2 minütiger Inkubation bei RT wurde der Ansatz für 5 min bei 4 °C und 16.000 x g zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und das DNA-Pellet mit 70 % Ethanol (v/v) gewaschen und erneut für 2 min bei 4 °C und 16.000 x g zentrifugiert. Dieser Schritt wurde ein zweites mal wiederholt bevor das DNA-Pellet in 35 µL sterilem dH<sub>2</sub>O aufgenommen wurde.

### 2.3.4 Bestimmung der DNA-Konzentration mittels NanoDrop

Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte photometrisch mittels NanoDrop ND-1000 bei einer Absorption von 260 nm (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland).

### **2.3.5 Agarose-Gelelektrophorese**

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten anhand ihrer Größe wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Hierbei wurden die DNA-Fragmente in einem 1-1,5 %-igen Agarosegel auf TAE-Basis gelelektrophoretisch aufgetrennt (130 V, 300 mA, 25 min). Die Visualisierung der DNA erfolgte mittels Ethidiumbromid bei UV-Licht ( $\lambda=312$  nm) unter Verwendung der digitalen Geldokumentationsanlage INTAS (Intas, Göttingen, Deutschland).

### **2.3.6 DNA-Sequenzierung**

Die Sequenzierung von DNA-Konstrukten wurde von der Firma GATC-Biotech AG (Konstanz, Deutschland) sowie SeqLab (Göttingen, Deutschland) durchgeführt. Hierzu wurden die DNA-Proben mit den entsprechenden Oligonukleotiden verschickt. Die Chromatogramme der Sequenzierung wurden mit der Software Geneious 4.8.5 ausgewertet.

### **2.3.7 DNA-Synthese**

Die Synthese der DNA von unterschiedlichen variablen Immunglobulin-Domänen wurde bei der Firma GeneArt® Gene Synthesis (Life Technologies GmbH) in Auftrag gegeben.

### **2.3.8 Enzymatische Restriktion von DNA**

Für den Restriktionsverdau von DNA wurden Typ II Restriktionsendonukleasen verwendet, welche ein sequenzspezifisches Schneiden von DNA-Fragmenten ermöglichen. Hierbei wurde zwischen analytischen und präparativen Restriktionsverdau unterschieden. Während der analytische Restriktionsverdau der Überprüfung der eingesetzten DNA dient, wird beim präparativen Verdau das Spaltprodukt für eine folgende Klonierung verwendet. Für die Restriktion wurden zumeist 1-5 µg DNA in einem Volumen von 40-100 µL eingesetzt und bei dem jeweiligen Temperatur-optimum der verwendeten Endonuklease für 2-3 h inkubiert. Die genaue Zusammensetzung eines Restriktionsansatzes richtete sich dabei nach den jeweiligen Herstellerangaben.

### **2.3.9 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten**

Um die Religation von linearisierter, doppelsträngiger DNA zu verhindern, wurde die endständige 5'-Phosphatgruppen mittels alkalischer Phosphatase entfernt. Hierfür wurde die aus einem

Restriktionsansatz stammende DNA für 30 min bei 37 °C mit dem Enzym *Calf Intestine Protease* (CIP) inkubiert. Anschließend erfolgte eine thermische Inaktivierung für 10 min bei 65 °C. Bevor die DNA für eine weitere Ligation verwendet wurde, erfolgte zudem eine DNA-Reinigung unter Verwendung kommerzieller Kitsysteme.

### 2.3.10 Ligation von DNA-Fragmenten

Bei einer gerichteten Ligation handelt es sich um die kovalente Verknüpfung von linearisierten DNA-Fragmenten mit komplementären DNA-Enden mittels der T4-DNA-Ligase. Das molekulare Verhältnis von einzusetzendem Insert zu Vektor sollte in etwa dem Verhältnis 3:1 entsprechen. Für die Berechnung der einzusetzenden Insertmenge wurde folgende Formel herangezogen:

$$\frac{\text{Menge Vektor [ng]} \cdot \text{Größe Insert [bp]}}{\text{Größe Vektor [bp]}} \cdot \text{molares Verhältnis} \left( \frac{\text{Insert}}{\text{Vektor}} \right) = \text{Menge Insert [ng]}$$

Die Ligation erfolgte bei RT für 1 h beziehungsweise über Nacht bei 16 °C und setzte sich wie folgt zusammen:

**Tabelle 2.15: Zusammensetzung eines Ligationsansatzes**

Komponente	Standardligation	Ligation für Antikörpergenbibliotheken
DNA - Vektor	50-100 ng	1000 ng
DNA - Insert	x ng	x ng
10 x Reaktionspuffer	2 µL	100 µL
T4-DNA-Ligase	1 U	3 U
dH <sub>2</sub> O	y µL	y µL
Σ	20 µL	100 µL

## 2.4 Biochemische Methoden

### 2.4.1 Reinigung von IgG sowie scFv-Fc-Antikörper mittels Protein A

Die Reinigung und Anreicherung von IgG sowie scFv-Fc-Antikörpern erfolgte entsprechend den Herstellerangaben mittels Profinia™ und der dazugehörigen Affinitätschromatographiesäule UNOsphere SUPRA (Bio-Rad, München). Nach Produktion löslicher Antikörper in HEK293-6E Zellen wurde der Zellkulturüberstand für 10 min bei 500 x g zentrifugiert, mit Bindepuffer versetzt und bei einer Porengröße von 0,45 µm filtriert. Nach automatisierter Reinigung und Elution in 4 mL

wurden die Proben anschließen filtriert (0,2 µm Porengröße), aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

### 2.4.2 Konzentrationsbestimmung von IgG sowie scFv-Fc-Antikörper mittels NanoDrop

Die Konzentrationsbestimmung von gereinigtem Antikörper erfolgte mittels NanoDrop ND-1000 bei einer Absorption von 280 nm (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland). Hierzu wurden unterschiedliche Antikörperversünnungen vermessen und die Konzentration mit dem jeweils ermittelten Korrekturfaktor bestimmt. Der verwendete Korrekturfaktor wurde für jeden Antikörper individuell aus dem Molekulargewicht und dem Extinktion Koeffizienten ermittelt.

### 2.4.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für die gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen wurde eine diskontinuierliche SDS-PAGE durchgeführt. Die Auftrennung erfolgte mittels eines 10-12 %-igem (w/v) SDS-PAA-Gels (siehe Tabelle 2.16) unter reduzierenden beziehungsweise nicht-reduzierenden Bedingungen. Hierfür wurden die Proteinproben zuvor mit Laemmli-Puffer versetzt. Für die Auftrennung unter reduzierenden Bedingungen wurde Laemmli-Puffer mit  $\beta$ -Mercaptoethanol ( $\beta$ Me) verwendet und die Proben für 10 min bei 95 °C denaturiert. Erfolgte hingegen eine Auftrennung unter nicht-reduzierenden Bedingungen, wurden die Proben für 10 min bei 56 °C mit Laemmli-Puffer ohne  $\beta$ Me inkubiert und anschließend für die gelelektrophoretische Auftrennung verwendet. Zusätzlich wurde ein molarer Massenstandard auf das SDS-PAA-Gel mit aufgetragen und die Gelelektrophorese bei 25 mA und 200 V für 40-50 min durchgeführt.

**Tabelle 2.16: Zusammensetzung der SDS-PAA-Gele**

Komponente	Volumen [µL]		
	Sammelgel (4 %)	Trenngel (10 %)	Trenngel (12 %)
dH <sub>2</sub> O	1000	1600	1300
30 % Acrylamidmix	260	1300	1600
1,5 M Tris-HCl pH 8,8	-	1000	1000
1,0 M Tris-HCl pH 6,8	200	-	-
10 % SDS	15	40	40
10 % APS	15	40	40
TEMED	2	2	2

#### 2.4.4 Visualisierung von Proteinen mittels Coomassie-Färbung

Im Anschluss der SDS-PAGE erfolgte eine Visualisierung von Proteinen mittels Coomassie-Färbung. Hierfür wurde das SDS-PAA-Gel für 1 min mit 20 mL Färbelösung in einer Mikrowelle erhitzt und für weitere 10 min auf einer Wippe inkubiert. Überschüssige Coomassie-Lösung wurde mit dH<sub>2</sub>O entfernt und das Gel erneut für 1 min in der Mikrowelle mit 20 mL Entfärbelösung erhitzt. Anschließend wurde das Gel für 30 min auf einer Wippe entfärbt, bis die Proteinbanden ohne Hintergrundfärbung sichtbar wurden.

#### 2.4.5 Western Blot

Für eine anschließende Immunfärbung von Proteinen wurden diese nach gelelektrophoretischer Auftrennung mittels Western Blot im *semi dry* Verfahren auf eine PVDF-Membran übertragen. Hierbei wurde ein mit Laufpuffer getränktes Filterpapier auf die Elektrodenplatte der *Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell* (Bio-Rad, München) gelegt. Darauf folgte die mit Methanol aktivierte PVDF-Membran und das SDS-PAA-Gel. Anschließend wurde eine weitere Schicht feuchtes Filterpapier aufgelegt und mit der zweiten Elektrodenplatte die Apparatur verschlossen. Der anschließende Transfer der Proteine auf die PVDF-Membran erfolgte bei 770 mA und 20 V für 45 min.

#### 2.4.6 Immunfärbung

Mittels Immunfärbung wurden die auf einer PVDF-Membran transferierten Proteine visualisiert. Um unspezifische Bindungsstellen zu blocken, wurde die PVDF-Membran zunächst für 30 min mit 20 mL 2 % MPBST (0,05 % (v/v) Tween 20) bei RT inkubiert. Nach einem 5 minütigen Waschschrift mit PBST (0,05 % (v/v) Tween 20) folgte eine Inkubation der PVDF-Membran mit dem primären Detektionsantikörper in 2 % MPBST (0,05 % (v/v) Tween 20) bei RT für 1 h. Anschließend wurde die PVDF-Membran 2 mal mit PBST (0,05 % (v/v) Tween 20) für 5 min gewaschen und mit dem sekundären Detektionsantikörper (konjugiert mit alkalischer Phosphatase (AP) beziehungsweise Meerrettichperoxidase (HRP)) für 1 h bei RT inkubiert. Daraufhin folgte ein weiterer Waschschrift mit PBST (0,05 % (v/v) Tween 20) für 5 min und die Äquilibration mit Substratpuffer. Die Visualisierung von AP-konjugiertem Detektionsantikörper erfolgte mittels NBT/BCIP, bei HRP-konjugiertem Antikörper wurde als Substrat DAB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> verwendet. Nach ausreichender Visualisierung der Proteinbanden wurde die PVDF-Membran mit dH<sub>2</sub>O gewaschen und dokumentiert.

### 2.4.7 Epitop-Kartierung

Für die Epitop-Kartierung wurde eine PepSpot-Membran der Firma JPT Peptide Technologies GmbH (Berlin, Deutschland) verwendet. Die jeweilige Aminosäuresequenz wurde durch mehrere Peptidspotsequenzen, bestehend aus 15 oder 9 Aminosäuren mit einer Überlappung von 4 beziehungsweise 8 Aminosäuren, auf eine Membran aufgebracht. Um eine Präzipitation hydrophober Peptide zu vermeiden wurde die Membran für 5 min mit Methanol inkubiert und 3 mal für 10 min mit TBS gewaschen. Anschließend wurde die Membran für 2 h in 20 mL 2 % MPBS abgesättigt und 3 mal für 5 min mit PBS gewaschen, bevor die Membran mit dem zu analysierendem scFv-Fc-Antikörper (10 µg/mL gelöst in 2 % MPBS) für 2 h inkubiert wurde. Nach dreimaligem Waschen für 5 min mit PBS wurde die Membran mit HRP-konjugiertem Detektionsantikörper (gelöst in 2 % MPBS) für 2 h bei RT inkubiert und erneut 3 mal mit PBS gewaschen, bevor die Peptidmembran mit Substatpuffer äquilibriert wurde und eine Färbung mit DAB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> als Substrat erfolgte.

### 2.4.8 *Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)*

Für den *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* wurden die 96 Kavitäten einer Polypropylen Mikrotiterplatte mit 100 µL Antigenlösung beziehungsweise Streptavidin (100-200 ng in PBS) über Nacht bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde die Antigenlösung durch dreimaliges Waschen mit PBST (0,05 % (v/v) Tween 20) entfernt und freie Bindungsstellen mit 300 µL 2 % MPBST (0,05 % (v/v) Tween 20) beziehungsweise 2 % BSA in PBS für 1 h bei RT geblockt und erneut mit PBST (0,05 % (v/v) Tween 20) gewaschen. Mit Streptavidin immobilisierte Polypropylen Mikrotiterplatten wurden anschließend für 30 min mit biotinyliertem Antigen bei RT inkubiert. Nach einem erneuten Waschschrift mit PBST (0,05 % (v/v) Tween 20) wurde die Antikörper in 2 % MPBST (0,05 % (v/v) Tween 20) gelöst, für 90 min bei RT mit dem immobilisiertem Antigen inkubiert und erneut mit PBST (0,05 % (v/v) Tween 20) gewaschen. Die Detektion gebundener Antikörper erfolgte mittels HRP-konjugierten Sekundärantikörper für 1 h bei RT. Nach dreimaligem Waschen mit PBST (0,05 % (v/v) Tween 20) wurden je Kavität 100 µL TMB-Substratlösung hinzupipettiert und die Farbreaktion mit 1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> gestoppt. Die Absorption wurden bei einer Wellenlänge von 450 nm gegen eine Referenzwellenlänge von 620 nm im Tecan Sunrise gemessen.

#### 2.4.9 *Human Capture ELISA*

Die Quantifizierung von Antikörper mit humanem Fc-Teil erfolgte mittels *Human Capture ELISA*. Zunächst wurden die Kavitäten einer Polypropylen Mikrotiterplatte mit 100 µL polyvalenten Ziegen anti-Mensch Antikörper (Sigma I 1761, 1:6.700 in PBS) für 1 h bei 37 °C immobilisiert. Anschließend wurden unspezifische Bindungsstellen mit 200 µL 30 % (v/v) FCS in PBS für 1 h bei 37 °C abgesättigt. Nach dreimaligem Waschen der Kavitäten mit PBST (0,05 % (v/v) Tween 20) wurden verschiedene Verdünnungen der zu bestimmenden Antikörper in PBS mit 1% (v/v) FSC sowie des Proteinstandards *Human N Protein Standard SL* (Siemens Healthcare, 9,91 mg/mL IgG) aufgetragen und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend folgte ein Waschschrift mit PBST (0,05 % (v/v) Tween 20) und Inkubation der Kavitäten mit je 100 µL HRP- konjugiertem Detektions-antikörper (Ziege anti-Mensch IgG (Fc-spez.), Sigma A0170, 1:70.000 in PBS mit 1% (v/v) FSC) für 1 h bei 37 °C. Nach erneutem Waschen der Kavitäten mit PBST (0,05 % (v/v) Tween 20) erfolgte die Detektion durch Zugabe von 100 µL TMB-Substratlösung. Nach 10-30 min wurde die Farbreaktion durch Zugabe von 100 µL 1N Schwefelsäure gestoppt und die Absorption bei 450 nm bei einer Referenzwellenlänge von 620 nm im Tecan Sunrise bestimmt.

#### 2.4.10 *In vitro* Endopeptidase Assay

Die Antikörper-vermittelte Inhibition der proteolytischen Spaltung von SNAP-25 durch Botulinum Neurotoxin A1 wurde mittels *in vitro* Endopeptidase Assays untersucht (Jones *et al.*, 2008). Hierfür wurde in einer Polypropylen Mikrotiterplatte eine Verdünnungsreihe der zu untersuchenden Antikörper mit einer finalen Konzentration von 43,5 pg/mL BoNT/A1 (10LD<sub>50</sub>/mL) in Reaktionspuffer (50 mM HEPES, 20 µM ZnCl<sub>2</sub>, pH 7,0, 0,5 % (v/v) Tween 20, 5 mM DTT) angesetzt und die Antikörper-Toxin-Mischung für 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden je 50 µL in die Kavitäten einer mit SNAP-25 Peptid (AA 137-206) immobilisierten Mikrotiterplatte überführt und für 18 h bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit Waschpuffer (PBS, 0,5 % (v/v) Tween 20) erfolgte der Nachweis von SNAP-25 Peptid (AA 137-206) mit je 100 µL Kaninchen anti-SNAP-25 (AA 190-197) Antikörper gelöst in 2,5 % MPBST (0,05 % (v/v) Tween 20) bei RT für 90 min. Nach erneutem Waschen wurden je Kavität 100 µL Ziege anti-Kaninchen HRP-konjugierter Nachweis-antikörper (Sigma A0545, 1:2000 in 2,5 % MPBST) hinzugegeben und für 90 min bei RT inkubiert. Die Detektion von gebundenen Nachweisantikörper erfolgte nach erneutem Waschen mit 100 µL Substratlösung (50 mM Zitronensäure (pH 4,0), 0,05 % (w/v) ABTS (2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure) Diammoniumsalz, 0,05 % (v/v) einer 30 % (v/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung). Die Farbreaktion wurden bei einer Wellenlänge von 405 nm im Multiskan MS vermessen.

## **2.5 Biophysikalische Methoden**

### **2.5.1 Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (SPR-Spektroskopie)**

Die Affinität von scFv-Fc-Antikörper zu BoNT/A1 wurde über die Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (*surface plasmon resonance spectroscopy*, SPR-Spektroskopie) mittels Biacore X (GE Healthcare) bestimmt. Gemäß der Herstellerangabe wurden 1000 Resonanzeinheiten (*resonance units*, RU) via Amin-Kopplung auf einem CM5 Chip immobilisiert. Die Messungen wurden mit 6 Verdünnungen von BoNT/A1 (0,16  $\mu$ M bis 5 nM) in HBS-EP Puffer bei einer Flussrate von 30  $\mu$ L/min für 1000 s durchgeführt. Nach jeder Verdünnungsstufe wurde der CM5 Chip mit Glycin (pH 1,5) für 30 s bei einer Flussrate von 10  $\mu$ L/min regeneriert. Die Bindungsparameter wurden anschließend mittels der BIAevaluation Software (Biacore) berechnet.

### **2.5.2 Analytische Größenausschlusschromatographie**

Mittels analytischer Größenausschlusschromatographie (SEC, *size exclusion chromatography*) wurde das Aggregationsverhalten von scFv-Fc-Antikörper sowie IgG unter Verwendung des Äkta purifier Systems untersucht. Für die Analysen von jeweils 150  $\mu$ g Antikörper wurde die Superdex200 *increase* 10/300 GL Säule bei einer Flussrate von 0,5 mL/min verwendet. Während der Analyse wurde der Verlauf der Absorption bei einer Wellenlänge von 280 nm aufgezeichnet. Mittels vorheriger Kalibrierung der Säule mit Proteinen definierter Größe konnte die Retentionszeit mit der Proteingröße korreliert und so das Aggregationsverhalten der untersuchten Antikörper beurteilt werden.

## **2.6 Zellbiologische Methoden**

### **2.6.1 Kultivierung von HEK293-6E-Zellen**

Bei der verwendeten Zellkulturlinie HEK293-6E handelt es sich um humane embryonale Nierenzellen, welche das Epstein-Barr-Nukleäre Antigen 1 (EBNA1) konstitutive exprimieren und als Suspensionszellen kultiviert werden. Die Kultivierung erfolgte in serumfreiem F17-Medium mit 7,5 mM L-Glutamin, 0,1 % (w/v) Pluronic-F68 und 25  $\mu$ g/mL G418 bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 110 rpm in Polycarbonat-Erlenmeyerkolben mit Entlüftungskappe. Die HEK293-6E-Zellen wurden alle 2-3 Tage in frisches F17-Medium überführt und auf eine Zelldichte von 200.000 Zellen/mL eingestellt.



### 2.6.2 Transfektion von HEK293-6E-Zellen

Für die Produktion von scFv-Fc und IgG in HEK293-6E-Zellen wurde eine transiente Transfektion unter Verwendung des Transfektionsreagenz Polyethylenimin (PEI) durchgeführt. Hierfür wurden jeweils 25 µg DNA beziehungsweise 62,5 µg PEI in 1,25 mL F17 Medium in einer Polystyrolplatte (24 Kavitäten) gemischt. Im Anschluss wurden beide Ansätze vereint und 20 min bei RT inkubiert. Die DNA-PEI-Mischung wurde mit 25 mL HEK293-6E-Zellen mit einer Zelldichte von  $1,5-2,0 \times 10^6$  Zellen/mL in einem 125 mL Polycarbonat Erlenmeyerkolben vereinigt. Die Kultivierung der transfizierten Zellen erfolgte bei 37 °C und 110 rpm bei einer CO<sub>2</sub>-Konzentration von 5 %. Nach 48 h wurden 25 mL frisches F17-Medium (7,5 mM L-Glutamine, 0,1 % (w/v) Pluronic F-68) und Trypton N1 (TN1, 0,5 % (w/v) finale Konzentration) hinzugegeben und für weitere 72-96 h bei 37 °C, 110 rpm und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Im Anschluss der Kultivierung wurden die HEK293-6E Zellen bei 500 x g zentrifugiert, der Produktionsüberstand filtriert (0,45 µm) und mittels einer Protein A Affinitätschromatographie angereicht und gereinigt.

## 2.7 Tierversuche

### 2.7.1 Immunisierung von Versuchstieren

Die Immunisierung eines männlichen Makaken (*Macaca fascicularis*) erfolgte durch 4 subkutanen Injektionen von 80 µg rekombinanten Botulinum Neurotoxin A1 leichte Kette (BoNT/A1-L, Metabionics Inc., Madison, WI, USA). Die ersten drei Injektionen wurden in einem Intervall von je einem Monat durchgeführt. Die vierte Injektion erfolgte nach weiteren acht Monaten. Die Immunisierung und Isolierung von Knochenmark erfolgte unter den in Frankreich gültigen ethischen Richtlinien und Gesetzen durch P. Thullier am *Centre de Recherche du Service de Santé des Armées* (CRSSA) in La Troche (Frankreich).

### 2.7.2 *Ex vivo Nervus phrenicus hemidiaphragma* Assay

Toxin-Neutralisationsstudien wurden mittels dem *ex vivo Nervus phrenicus hemidiaphragma* Assay durchgeführt. Hierzu wurde eine Präparation des linken *Nervus phrenicus hemidiaphragma* einer BALB/c Maus in ein mit Krebs-Gelatine-Puffer gefülltes Organbad überführt und bei 37 °C mit 95 % O<sub>2</sub> und 5 % CO<sub>2</sub> begast. Eine kontinuierliche, indirekte Stimulierung durch den *Nervus phrenicus* wurde mittels einer supramaximalen Spannung (~3 V, 1 Hz, 0,2 ms) erreicht und die Muskelkontraktion mittels isometrischen Kraftmesser, verbunden mit einem Messbrücken-

verstärker und einem PowerLab/4SP 4 Aufzeichnungsgerät, gemessen. Fünf bis Zehn Minuten vor der Zugabe der Antikörper-Toxin-Mischung und vor Beendigung des Experimentes erfolgte eine direkte Muskelstimulierung (~30 V, 1 Hz, 1 ms). Für die Neutralisationsstudien wurde eine Antikörper-Toxin-Mischung mit 87 pg/mL BoNT/A1 (20LD<sub>50</sub>/mL) in 6 mL Krebs-Medium angesetzt und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde der Krebs-Gelatine-Puffer aus dem Organbad entnommen, die Antikörper-Toxin-Mischung zugegeben und die Muskelkontraktionen über eine Zeit von 5 h beziehungsweise bis keine Muskelkontraktion mehr messbar war aufgezeichnet. Die 50 % Paralysezeit wurde über ein Fitting des linearen Bereichs der Paralysekurve ermittelt. Die linearen und nicht-linearen Regressionsanalysen wurden mittels der Software Prism 6 (GraphPad Software) durchgeführt.

### 2.7.3 *In vivo* Paralyse Assay

Die Protektivität von anti-BoNT/A1 spezifischen Antikörpern wurde mittels dem *in vivo* Paralyse Assay in BALB/c Mäusen untersucht. Zunächst wurden die Antikörper (25 ng bis 100 µg/Dosis) in GPB (*Gelatine Phosphat Buffer*) gelöst, mit BoNT/A1 (0,4LD<sub>50</sub>) versetzt und für 1 h bei RT inkubiert. Anschließend wurden je 100 µL Antikörper-Toxin-Mischung in die linke *regio inguinalis* von BALB/c Mäusen injiziert. BoNT/A1 führt in der *regio inguinalis* zu einer schlaffen Muskelparalyse, welches sich in einer abdominalen Ptosis äussert. Für jede Antikörperkonzentration wurden 4 BALB/c Mäuse mit der Antikörper-Toxin-Mischung behandelt und die Ausprägung der abdominalen Ptosis nach 24 h beziehungsweise 48 h von 3 Personen unabhängig voneinander anhand einer Skala von 0 – 4, wobei 0 – Negativ, 1 – Bedingt, 2 – Moderat, 3 – Erheblich und 4 – Maximal entsprach, beurteilt. Zusätzlich wurde als Kontrolle eine Gruppe von BALB/c Mäusen mit einer Injektion von BoNT/A1 sowie eine Weitere mit den jeweiligen Antikörpern ohne BoNT/A1 behandelt.

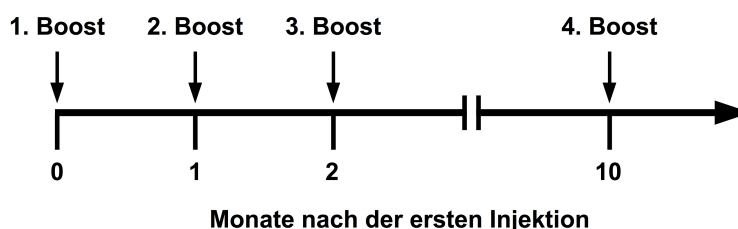
### 2.7.4 *In vivo* Maus Letalitäts (MLD) Assay

Die Toxin-Neutralisation von anti-BoNT/A1 spezifischen Antikörpern wurde mittels dem *in vivo* Maus Letalitäts Test analysiert. Hierfür wurden unterschiedliche Antikörperkonzentrationen mit der 10-fachen Maus letalen Dosis pro mL (10MLD<sub>50</sub>/mL, BoNT/A1) in 50 mM Phosphatpuffer (pH 6,5, 1 % (w/v) Gelatine) für 30 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden je 0,5 mL in swiss Mäusen (20-22 g) intraperitoneal (i.p.) injiziert. Die Mäuse (4-8 Mäuse je Gruppe) wurden über einen Zeitraum von 4 Tagen beobachtet und auftretende Intoxikationssymptome aufgezeichnet.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Konstruktion der anti-BoNT/A1-L Antikörpergenbibliothek

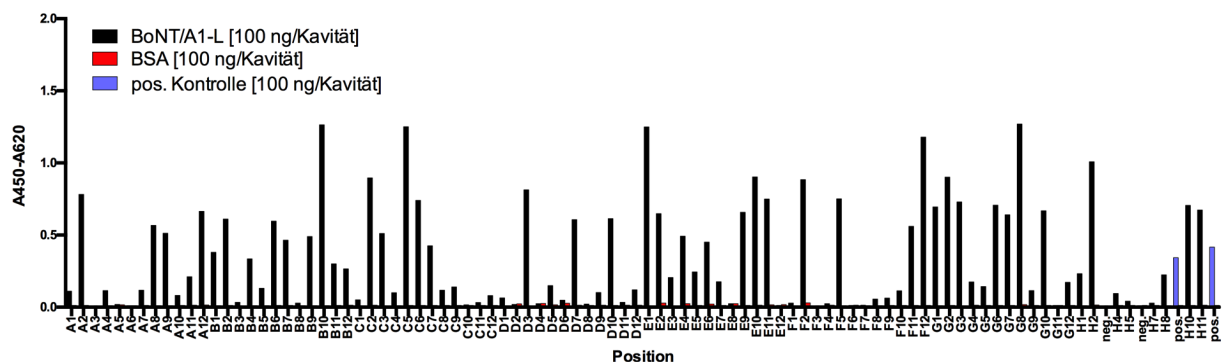
Für die Generierung der anti-BoNT/A1-L Antikörpergenbibliothek wurde ein männlicher Makake (*Macaca fascicularis*) mit der rekombinant hergestellten Variante der leichten Kette von Botulinum Neurotoxin A1 (BoNT/A1-L) immunisiert. Die Immunisierung erfolgte mittels vier subkutanen Injektionen. Die ersten drei Injektionen wurden in einem Intervall von je einem Monat durchgeführt. Die vierte Injektion erfolgte nach weiteren acht Monaten. Eine schematische Darstellung der Immunisierung ist in Abbildung 3.1 aufgeführt. Die Immunantwort wurde mittels ELISA gegen das Holotoxin von BoNT/A1 verifiziert (Daten nicht gezeigt). Zehn Tage nach dem dritten Boost wurde der Antikörpertiter gemessen und entsprach  $1:10^6$ . Acht Monate später erfolgte eine weitere Injektion mit BoNT/A1-L. Anschließend wurde nach 6 und 10 Tagen nach erfolgter Immunisierung erneut Knochenmark entnommen und der Antikörpertiter ermittelt. Der Antikörpertiter nach Tag 10 entsprach  $1:10^6$  und impliziert eine stabile Hyperimmunantwort. Anschließend erfolgte die Isolierung der RNA aus den Knochenmarkproben von Tag 6 und 10 nach der vierten Injektion und die Amplifikation der VH und VL Gensequenzen. Die entsprechenden Amplifikate von VH und VL wurden vereint und für die Generierung einer  $\kappa$ - sowie Fd-Subbibliothek in pGEM®-T mit einer Diversität von  $10^4$  und  $5 \times 10^4$  individuelle Klone verwendet. Die Klonierung der finalen Antikörpergenbibliothek erfolgte in dem Phagen Display Vektor pHAL32. Dieser wurde zuvor durch Modifizierung von pHAL14 (Hust *et al.*, 2011) erzeugt und beinhaltet eine zusätzliche Restriktionschnittstelle (*Sfi*I) für die Klonierung von VH. Die scFv-Antikörpergenbibliothek wurde in zwei aufeinanderfolgenden Klonierungsschritten generiert. Zunächst erfolgte die Klonierung von VL mittels *Mlu*I und *Not*I sowie im Anschluss die Klonierung von VH mittels *Sfi*I und *Hind*III. Die finale scFv-Antikörpergenbibliothek beinhaltete eine Diversität von  $3,2 \times 10^8$  individuellen Klone und eine scFv-Insertionrate von 80 %. Die Verpackung erfolgte sowohl mit M13K07 sowie Hyperphage und erzielte einen Phagentiter von  $9 \times 10^{13}$  cfu/mL sowie  $6 \times 10^{11}$  cfu/mL.



**Abbildung 3.1: Schematische Darstellung der Immunisierung.** Ein männlicher Makake (*Macaca fascicularis*) wurde mit 4 subkutanen Injektionen von 80  $\mu$ g BoNT/A1-L immunisiert. Die ersten drei Injektionen erfolgten in einem Intervall von je einem Monat. Die vierte Injektion erfolgt 8 Monate später.

### 3.2 Selektion spezifischer scFv-Antikörper gegen die leichte Kette von BoNT/A1

Für die Selektion spezifischer scFv-Antikörper aus der mit Hyperphage verpackten Antikörpergenbibliothek wurde ein *panning* in 3 Selektionsschritten gegen die rekombinante leichte Kette von BoNT/A1 durchgeführt. Nach der 3. Selektionsrunde wurden  $5,5 \times 10^8$  scFv-Phagen eluiert und 92 individuelle Klone für die Produktion löslicher scFv-Antikörper sowie dem anschließenden *screening* mittels Antigen-ELISA gegen BoNT/A1-L verwendet (Abbildung 3.2). Basierend auf den Ergebnissen des Antigen-ELISAs wurden 43 scFv-Klone als spezifisch gegen BoNT/A1-L identifiziert. Die Diversität wurde mittels eines *Bst*NI Verdau der jeweiligen scFv-Sequenzen und anschließender Sequenzierung ermittelt. Von den zuvor 43 ausgewählten scFv-Klonen wurden 5 anhand der DNA-Sequenz als individuelle scFv identifiziert (Tabelle 3.1).



**Abbildung 3.2: Antigen-ELISA zur Identifizierung BoNT/A1-L spezifischer scFv-Antikörper.** Exemplarische Darstellung eines *screening* ELISAs im Anschluss der Selektion von scFv-Antikörper mittels Antikörper Phagen Display. Eine Polypropylen Mikrotiterplatte wurden mit je 100 ng BoNT/A1-L beziehungsweise BSA pro Kavität beschichtet. Als Positiv-Kontrolle (Blau) diente der anti-Lysozym Antikörper D1.3 (scFv). Hierfür wurden die Kavitäten H9 und H12 mit Lysozym beschichtet. Die Kavitäten H3 und H6 dienen als Negativ-Kontrolle ohne produzierten scFv. Nach der Produktion löslicher scFv wurden je 50  $\mu$ L vom Produktionsüberstand mit 50  $\mu$ L 2 % MPBST (0,05 % (v/v) Tween 20) gemischt und im Antigen-ELISA getestet. Der Nachweis gebundener scFv erfolgte mittels Maus anti-c-myc IgG (9E10, 1:1.000) sowie mittels Ziege anti-Maus (Fc-spezifisch) HRP-konjugiertem Sekundärantikörper (1:20.000). Die Visualisierung erfolgte anschließend mittels TMB-Färbung.

### 3.3 Selektion spezifischer scFv-Antikörper gegen das Holotoxin BoNT/A1

Die Selektion von spezifischen scFv-Antikörper gegen das Holotoxin BoNT/A1 erfolgte sowohl mit Hyperphage als auch M13K07 verpackter Antikörpergenbibliothek in 3 Selektionsrunden. Nach der dritten Selektionsrunde wurden für die mit Hyperphage verpackte Antikörpergenbibliothek  $6,2 \times 10^3$  scFv-Phagen, mit der M13K07 verpackten Antikörpergenbibliothek hingegen  $1,3 \times 10^5$  scFv-Phagen isoliert. Für die Identifizierung spezifisch bindender scFv wurden 25 (Hyperphage-Bibliothek) beziehungsweise 75 scFv-Klone (M13K07-Bibliothek) für die Produktion löslicher scFv verwendet und mittels Antigen-ELISA analysiert. Insgesamt wurden 26 spezifisch gegen BoNT/A1

(Holotoxin) bindende scFv-Klone isoliert und mittels *Bst*NI Verdau sowie anschließender Sequenzierung näher charakterisiert. Von den identifizierten 26 scFv-Klonen wurden 2 individuelle scFv-Antikörper aus der Hyperphage verpackten Antikörpergenbibliothek und 15 individuelle scFv aus der M13K07 verpackten Antikörpergenbibliothek isoliert (Tabelle 3.1).

**Tabelle 3.1: Übersicht der eluierten Phagen.** Darstellung der eluierten Phagen [cfu] nach jeder Selektionsrunde sowie die Anzahl der selektierten scFv-Antikörper.

Antigen	Verwendeter Helferphage	Eluierte Phagen [cfu] nach jeder Selektionsrunde			Anzahl selektierter scFv
		1. Runde	2. Runde	3. Runde	
BoNT/A1-L	Hyperphage	$8,4 \times 10^6$	$6,8 \times 10^4$	$5,5 \times 10^8$	5
BoNT/A1	M13K07	$1,2 \times 10^5$	$1,8 \times 10^3$	$1,3 \times 10^5$	15
BoNT/A1	Hyperphage	$2 \times 10^3$	$2 \times 10^2$	$6,2 \times 10^3$	2

### 3.4 Sequenzanalyse der isolierten anti-BoNT/A1 scFv

Im Anschluss der Sequenzierung der selektierten scFv-Antikörper wurden die CDRs und Keimbahnlinien mit der Datenbank VBASE2 (Mollova *et al.*, 2010) sowie IMGT/V-QUEST, vom *international ImMunoGeneTics information system*<sup>®</sup> (IMGT) (<http://www.imgt.org>), analysiert. Die Analyse der VH Genfamilien brachte zum Vorschein, dass bis auf IGHV2 und IGHV5 sämtliche Genfamilien in den 22 selektierten scFv vertreten waren, jedoch IGHV4 dominierte. Diese waren zudem mit sämtlichen IGHD Genen in Verbindung mit IGHJ4 kombiniert. IGHJ4 war die dominierende J VH-Region in sämtliche scFv bis auf je eine Ausnahme von IGHJ1 und IGHJ5. Die Diversität der VL Genfamilien beschränkte sich auf IGKV1, IGKV2 und IGKV3, wobei IGKV1 die dominierende Genfamilie darstellte und lediglich 3- beziehungsweise 2-mal die Genfamilien IGKV2 und IGKV3 vertreten waren. Die Anzahl der J VL-Regionen bezog sich auf IGKJ1, IGKJ2 und IGKJ3, wobei IGKJ1 am häufigsten vertreten war (Tabelle 3.2). Zusätzlich zu den hier beschriebenen scFv wurde 2H8 in die Sequenzanalysen miteinbezogen (siehe Tabelle 3.2). Hierbei handelt es sich um einen scFv, welcher die Proteaseaktivität von BoNT/A1-L inhibiert und im Rahmen von AntiBotABE aus einer vorherigen Antikörpergenbibliothek selektiert wurde (Chahboun *et al.*, 2011). Für den therapeutischen Einsatz von Antikörpern ist deren potenzielle Immunogenität von großer Bedeutung. Eine Angabe, wie „human“ ein rekombinant generierter Antikörper ist, bietet der *Germinality Index* (GI). Hierfür wurde die Aminosäuresequenz im Bereich der *framework* Regionen der jeweiligen leichten und schweren Kette der selektierten scFv mit den humanen Keimbahnlinien, welche eine möglichst hohe Homologie zu den jeweiligen variablen Domänen der scFv aufwiesen, verglichen. Die Sequenzhomologie wurde anschließend in Prozent

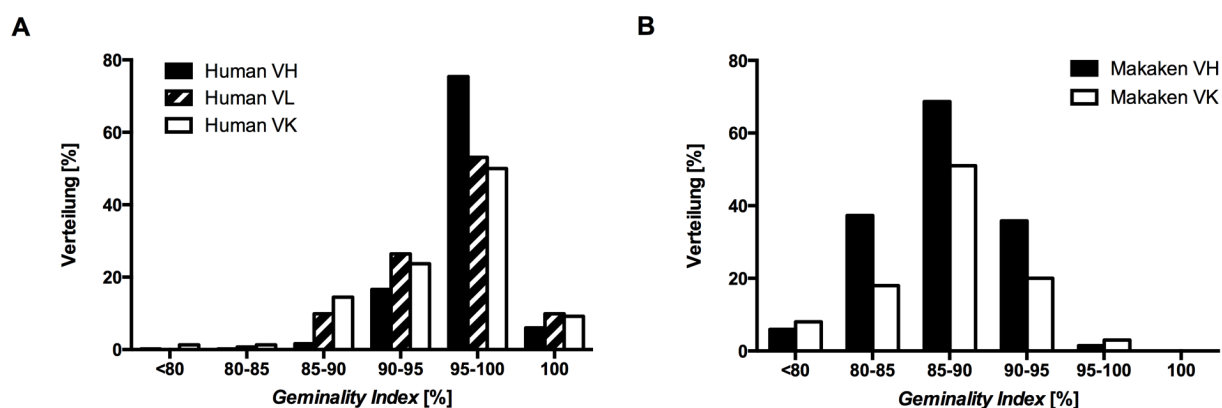
dargestellt (Tabelle 3.2).

**Tabelle 3.2: Sequenzanalysen der selektierten anti-BoNT/A1-L scFv.** Die Gene der humanen Keimbahnlinien mit der höchsten Homologie zu den jeweiligen scFv wurde mittels VBASE2 sowie IMGT/V-QUEST ermittelt sowie der *Germinality Index* (GI) der variablen Domänen mittels IMGT/DomainGapAlign bestimmt.

scFv	Antigen und Helferphage	VH			VL		GI [%]	
		V	D	J	V	J	VH	VL
2H8	Chahboun <i>et. al</i> 2011	IGHV1-2*02	IGHD2-21*01	IGHJ5*02	IGKV3-11*01	IGKJ2*04	85,7	92,1
SEM95-A9	BoNT/A1-L, Hyperphage	IGHV3-h*01	IGHD6-13*01	IGHJ4*02	IGKV3-7*02	IGKJ1*01	79,1	77,5
SEM95-B4		IGHV3-66*01	IGHD2-15*01	IGHJ4*02	IGKV1-12*01	IGKJ1*01	89,0	92,1
SEM95-B10		IGHV3-66*01	IGHD2-21*01	IGHJ4*02	IGKV2-30*02	IGKJ1*01	84,6	86,5
SEM95-C6		IGHV3-h*01	IGHD6-13*01	IGHJ4*02	IGKV2-30*02	IGKJ1*01	79,1	86,5
SEM95-G8		IGHV3-h*01	IGHD6-13*01	IGHJ1*01	IGKV2-30*02	IGKJ1*01	87,9	86,5
SEM119-IE2	Holotoxin BoNT/A1, Hyperphage	IGHV4-59*04	IGHD3-22*01	IGHJ4*02	IGKV1-13*02	IGKJ1*01	90,1	88,7
SEM119-IE3		IGHV3-66*02	IGHD3-9*01	IGHJ4*02	IGKV1-9*01	IGKJ1*01	87,9	89,9
SEM120-IA1	Holotoxin BoNT/A1, M13K07	IGHV4-39*07	IGHD1-26*01	IGHJ4*02	IGKV1-13*02	IGKJ3*01	87,9	85,4
SEM120-IB4		IGHV4-59*04	IGHD3-22*01	IGHJ4*02	IGKV1-13*02	IGKJ3*01	91,2	89,9
SEM120-IE4		IGHV4-59*04	IGHD3-22*01	IGHJ4*02	IGKV1-13*02	IGKJ3*01	91,2	87,6
SEM120-IID5		IGHV4-59*04	IGHD1-26*01	IGHJ4*02	IGKV1-13*02	IGKJ1*01	89,0	89,9
SEM120-IIE5		IGHV4-59*04	IGHD4-17*01	IGHJ4*02	IGKV1-13*02	IGKJ1*01	93,4	86,5
SEM120-IIIA1		IGHV4-39*07	IGHD1-26*01	IGHJ4*02	IGKV1-13*02	IGKJ3*01	89,0	85,4
SEM120-IIIA3		IGHV4-59*04	IGHD3-22*01	IGHJ4*02	IGKV1-13*02	IGKJ1*01	91,2	88,7
SEM120-IIIB3		IGHV4-59*04	IGHD1-26*01	IGHJ4*02	IGKV1-13*02	IGKJ3*01	89,0	85,4
SEM120-IIIC1		IGHV1-8*02	IGHD3-22*01	IGHJ4*02	IGKV1-39*01	IGKJ3*01	86,8	87,6
SEM120-IIIC3		IGHV4-28*01	IGHD3-22*01	IGHJ4*02	IGKV1-13*02	IGKJ3*01	92,3	85,4
SEM120-IIIC4		IGHV4-59*04	IGHD1-26*01	IGHJ4*02	IGKV1-13*02	IGKJ1*01	90,1	89,9
SEM120-IVC5		IGHV1-2*02	IGHD2-21*01	IGHJ5*02	IGKV3-20*01	IGKJ2*03	86,8	88,7
SEM120-IVD3		IGHV4-28*01	IGHD3-22*01	IGHJ4*02	IGKV1-13*02	IGKJ1*01	89,0	89,9
SEM120-IVE4		IGHV4-28*01	IGHD3-22*01	IGHJ4*02	IGKV1-13*02	IGKJ1*01	86,8	88,7
SEM120-IVE5		IGHV4-59*04	IGHD3-22*01	IGHJ4*02	IGKV1-13*02	IGKJ1*01	90,1	88,7

Der *Germinality Index* für die einzelnen Domänen lag zwischen 80 % und 93 % Identität. Für einen genaueren Vergleich wurde zudem der GI von 500 scFv aus der humanen Antikörpergenbibliothek HAL7/8 (Hust *et al.*, 2011) berechnet und dessen Verteilung grafisch dargestellt (Abbildung 3.3, A).

Hierbei lag die durchschnittliche Identität sämtlicher VH Sequenzen bei 97 %. Von den 500 humanen scFv enthielten 76 eine kappa und 424 eine lambda VL mit einem gemitteltem *Germinality Index* von jeweils 95 %. Des Weiteren wurde die GI-Verteilung von 100 scFv aus unterschiedlichen Makaken Immunbibliotheken ermittelt und die durchschnittliche Identität zu den humanen Keimbahnlagen berechnet (Abbildung 3.3, B). Hierbei lag der durchschnittliche GI für die schwere sowie für die leichte Kette bei 87 %.



**Abbildung 3.3: Germinality Index (GI) Verteilung von humanen und Makaken variablen Domänen. A)** GI-Verteilung von 500 humanen scFv der Antikörpergenbibliothek HAL7/8. Berechnet wurde die prozentuale Identität der variablen Domänen mit den korrespondierenden humanen Keimbahnlagen. **B)** GI-Verteilung von 100 scFv aus einer Makaken Antikörpergenbibliothek.

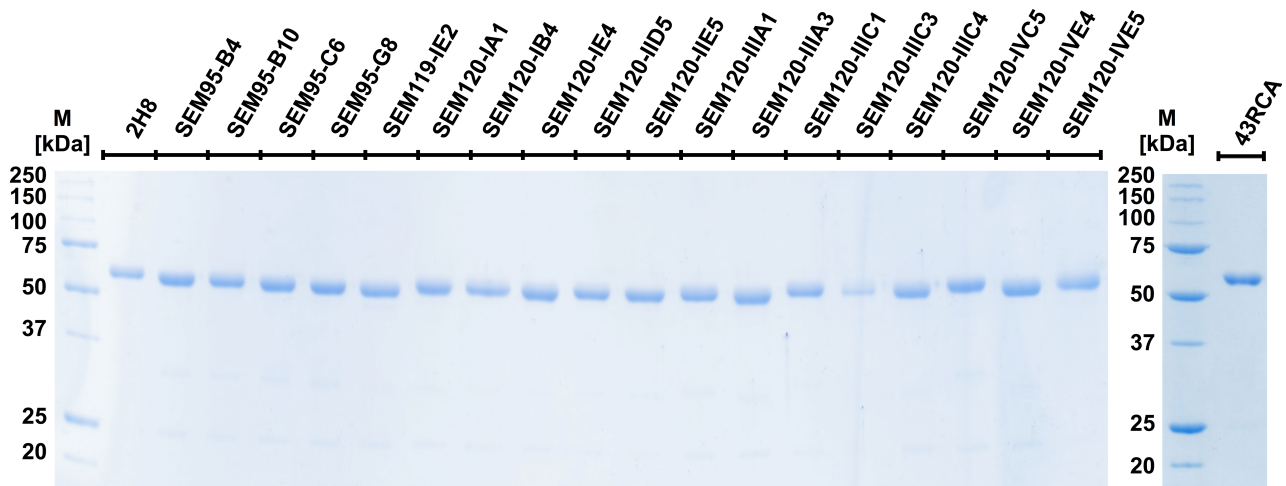
### 3.5 Konvertierung der scFv-Antikörper in das scFv-Fc-Format

Für die weiterführende Charakterisierung der selektierten scFv gegen BoNT/A1 wurden diese in das IgG-ähnliche scFv-Fc-Antikörperformat konvertiert.

#### 3.5.1 Klonierung, Produktion und Reinigung der anti-BoNT/A1-L scFv als scFv-Fc-Antikörper

Sämtliche selektierten Antikörper gegen BoNT/A1-L, zuzüglich 2H8 (Chahboun *et al.*, 2011) und 43RCA (Pelat *et al.*, 2009) (anti-Rizin, Negativ-Kontrolle), wurden für weiterführende Analysen als scFv-Fc Antikörper produziert. Hierfür wurden die Gensequenzen der scFv in den eukaryotischen Expressionsvektor pCSE2.5-mIgG2c-Fc-XP kloniert (Jäger *et al.*, 2013). Anschließend erfolgte die transiente Transfektion von HEK293-6E Suspensionszellen und deren Kultivierung über einen Zeitraum von 5 Tagen. Während der Produktion der scFv-Fc-Antikörper wurden diese in das Kulturmedium sekretiert. Anschließend wurden die scFv-Fc-Antikörper mittels Protein A Affinitätschromatographie gereinigt und in PBS umgepuffert. Insgesamt wurden 18 der 22 gegen BoNT/A1-L

selektierten scFv sowie 2H8 und 43RCA erfolgreich als scFv-Fc-Antikörper produziert. Die Konzentration der jeweiligen Eluate wurde photometrisch mittels dem NanoDrop1000 System bestimmt und die Proteinreinheit über eine SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung analysiert (Abbildung 3.4).



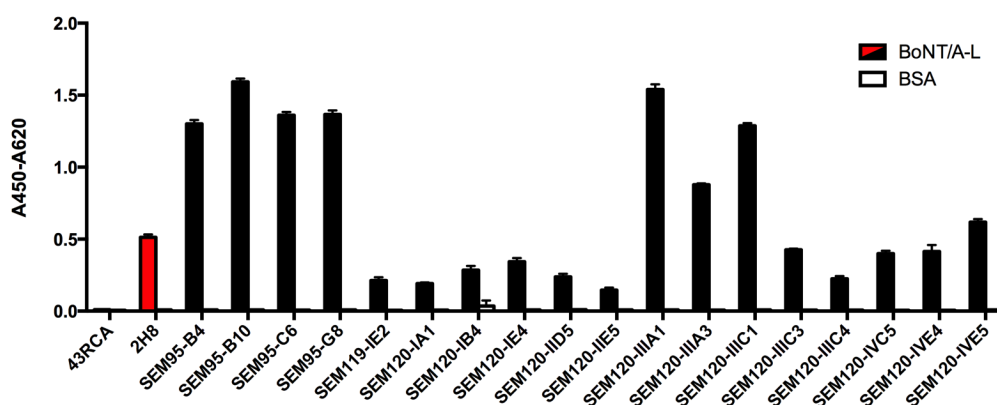
**Abbildung 3.4: SDS-PAGE der produzierten scFv-Fc-Antikörper.** Zur Überprüfung der Reinheit der produzierten scFv-Fc nach erfolgter Protein A Affinitätschromatographie wurde mit je 1 µg scFv-Fc eine SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen (Laemmli-Puffer mit β-Mercaptoethanol, 95 °C) mit einem 12 %-igem PAA-Gel durchgeführt und anschließend mittels Coomassie-Färbung visualisiert.

Das Molekulargewicht eines scFv-Fc-Antikörpers als Homodimer beträgt in etwa 110 kDa, unter reduzierenden Bedingungen liegt der scFv-Fc als Monomer mit einem Molekulargewicht von ca. 55 kDa vor. Während der SDS-PAGE besaßen unter reduzierenden Bedingungen sämtliche produzierten scFv-Fc ein identisches Laufverhalten und lagen bei etwa 55 kDa.

### 3.5.2 Produktionskontrolle der anti-BoNT/A1-L scFv-Fc mittels Antigen-ELISA

Für weitere Charakterisierungen der BoNT/A1 spezifischen scFv-Fc-Antikörper wurde die Antigenbindung mittels ELISA überprüft. Hierfür wurde ein Antigen-ELISA mit je 1 µg scFv-Fc-Antikörper auf 100 ng immobilisiertem Antigen (BoNT/A1, rekombinante leichte Kette) durchgeführt (Abbildung 3.5). Zusätzlich zu den 19 BoNT/A1 spezifischen scFv-Fc wurde 43RCA analysiert, um für folgende Neutralisationsstudien eine Kreuzreaktivität des als Negativ-Kontrolle vorgesehenen anti-Rizin Antikörpers mit BoNT/A1-L auszuschließen. Sämtliche gegen BoNT/A1 selektierten Antikörper banden im scFv-Fc-Format mit unterschiedlicher Intensität die leichte Kette von BoNT/A1, jedoch nicht BSA als Kontroll-Antigen. Des Weiteren wies der für die Negativ-Kontrolle vorgesehene anti-Rizin Antikörper keine Kreuzreaktivität zu BoNT/A1-L auf.





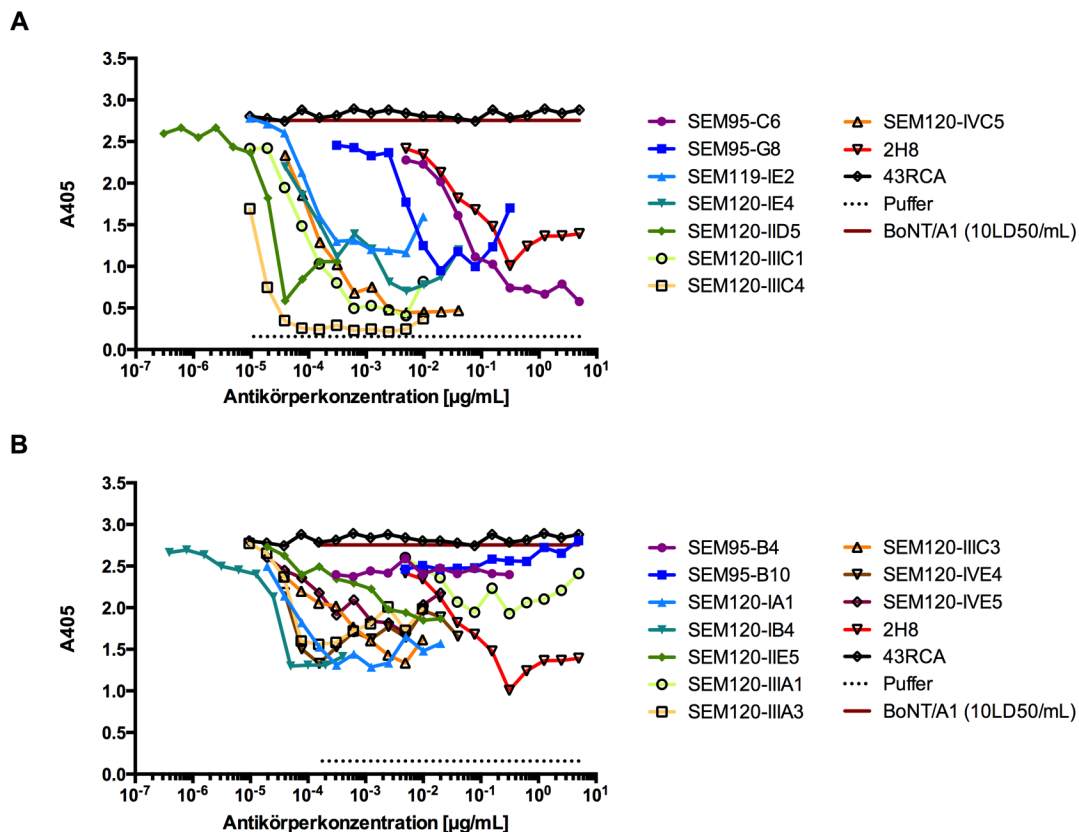
**Abbildung 3.5: Antigen-ELISA der BoNT/A1-L spezifischen scFv-Fc-Antikörper.** Validierung der 19 produzierten anti-BoNT/A1 scFv-Fc (inklusive 2H8; Positiv-Kontrolle) sowie des anti-Rizin Antikörpers (43RCA; Negativ-Kontrolle) mittels Antigen-ELISA. Je 1 µg scFv-Fc-Antikörper wurde mit 100 ng immobilisiertem Antigen (rekombinante leichte Kette von BoNT/A1 sowie BSA) inkubiert und die Bindung mittels Ziege anti-Maus (Fc-spezifisch) HRP-konjugiertem Sekundärantikörper (1:20.000) und TMB-Färbung detektiert.

### 3.6 Charakterisierung der anti-BoNT/A1-L scFv-Fc-Antikörper mittels *in vitro* und *ex vivo* Assays

Die Toxin inhibierenden beziehungsweise neutralisierenden Eigenschaften der gegen BoNT/A1 selektierten Antikörper wurde mittels dem ELISA basierendem *in vitro* Endopeptidase Immunassay sowie dem Gewebe basierendem *Nervus phrenicus hemidiaphragma* Assay (*ex vivo*) analysiert. Sämtliche Arbeiten bezüglich der *in vitro* und *ex vivo* Assays erfolgten in Zusammenarbeit mit dem *National Institute for Biological Standards and Controls* (NIBSC).

#### 3.6.1 *In vitro* Endopeptidase Immunassay

Mittels *in vitro* Endopeptidase Immunassay wurde die Antikörper-vermittelte Toxin-Inhibition am *National Institute for Biological Standards and Control* (NIBSC) analysiert. Hierbei wurde der Einfluss der scFv-Fc-Antikörper auf die enzymatische Spaltung von SNAP-25 durch BoNT/A1 untersucht. Von den BoNT/A1 spezifischen scFv-Fc wurde eine Verdünnungsreihe erstellt und mit je 43,5 pg/mL BoNT/A1 (10LD<sub>50</sub>/mL) versetzt. Nach 1 stündiger Inkubationsdauer bei RT wurde die Toxin-Antikörper-Mischung auf eine mit SNAP-25 (Peptid 137-206) beschichtete Mikrotiterplatte überführt und für 18 h inkubiert. Das Spaltprodukt von SNAP25 wurde anschließend mit einem anti-SNAP-25 (Peptid 190-197) Detektionsantikörper nachgewiesen (Abbildung 3.6).



**Abbildung 3.6: In vitro Endopeptidase Inhibition von BoNT/A1.** Konzentrationsabhängige Inhibition der Endopeptidase Aktivität von BoNT/A1 (43,5 µg/mL; 10LD<sub>50</sub>/mL) durch die anti-BoNT/A1-L spezifischen scFv-Fc-Antikörper. **A)** Endopeptidase Immunassay der 8 besten scFv-Fc mit Inhibition der Endopeptidase Aktivität von BoNT/A1. **B)** Endopeptidase Immunassay der scFv-Fc-Antikörper ohne beziehungsweise mit geringer Inhibition der Endopeptidase Aktivität von BoNT/A1. (Durchgeführt vom *National Institute for Biological Standards and Control* (NIBSC), UK)

Der resultierende Kurvenverlauf entspricht der Funktion der Endopeptidase Aktivität von BoNT/A1, bei der eine Reduktion der Signalstärke im ELISA um 50 % eine um 50 % verminderte Endopeptidase Aktivität bedeutet (Abbildung 3.6). Der anti-Rizin Antikörper 43RCA diente als Negativ-Kontrolle und wies im Endopeptidase Assay keine Toxin-Inhibition auf. Der 2H8 diente hingegen als Positiv-Kontrolle, von dem bereits bekannt war, dass dieser die Endopeptidase Aktivität von BoNT/A1 inhibiert (Chahboun *et al.*, 2011). Für 3 scFv-Fc-Antikörper SEM95-B4, SEM95-B10 und SEM120-IIIA1 wurde keine beziehungsweise eine im Vergleich zu 2H8 schlechtere Inhibition der Endopeptidase Aktivität gemessen (Abbildung 3.6, B). Von 8 scFv-Fc-Antikörper, welche die Endopeptidase Aktivität von BoNT/A1 inhibierten, konnte die Antikörperkonzentration bestimmt werden bei der 50 % Inhibition (IC<sub>50</sub>) erreicht wurde (Abbildung 3.6, A). Zusätzlich zum IC<sub>50</sub> wurde für diese Antikörper das molare Verhältnis (scFv-Fc:Toxin) korrelierend zum IC<sub>50</sub> bestimmt (Tabelle 3.3). Mit einem IC<sub>50</sub>-Wert von  $1,5 \times 10^{-5}$  µg/mL erzielte SEM120-IIIC4 die stärkste gemessene Inhibition und entspricht einem molarem Verhältnis von scFv-Fc zu Toxin von 0,5 zu 1.

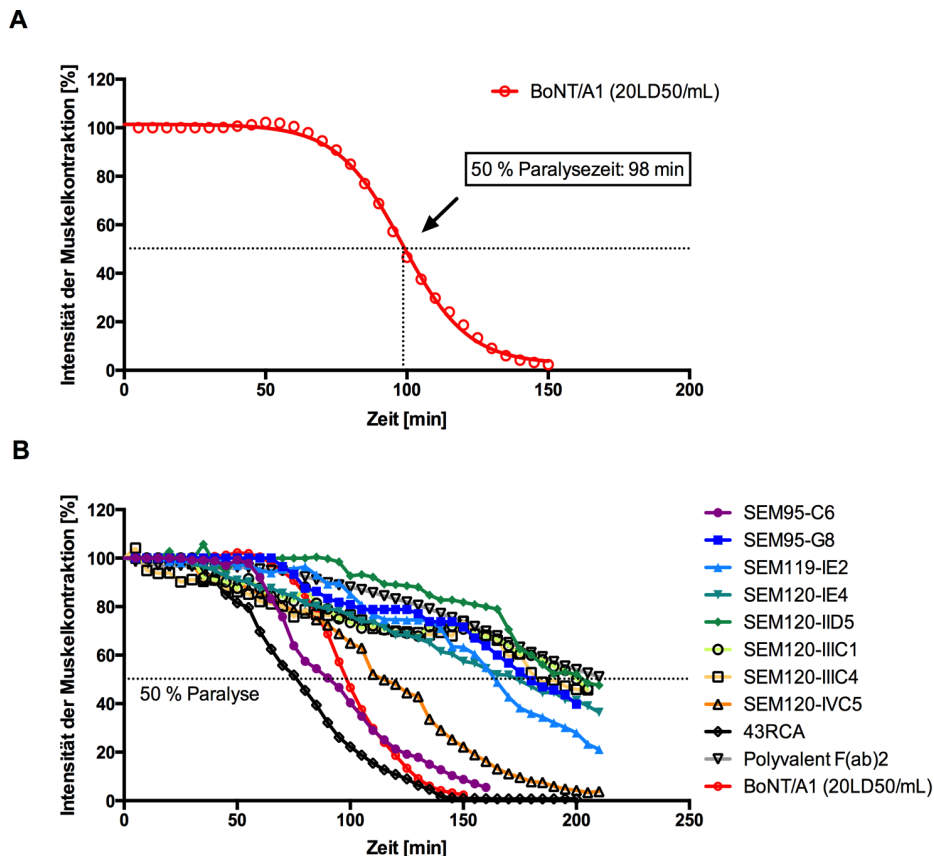
Dies entspricht einem molarem Verhältnis von 1:1 je Antikörper-Bindungsstelle.

**Tabelle 3.3: *In vitro* Endopeptidase Inhibition von BoNT/A1.** Angabe die Konzentration an scFv-Fc bei der die Endopeptidase Aktivität von BoNT/A1 (43,5 µg/mL; 10LD<sub>50</sub>/mL) um 50 % inhibiert wurde, zusammen mit dem entsprechendem molaren Verhältnis von scFv-Fc zu Toxin. Die Negativ-Kontrolle (43RCA) ergab bei eine Konzentration von 5 µg/mL keine Inhibition der Endopeptidase Aktivität von BoNT/A1.

Antigen	scFv-Fc	Antikörperkonzentration bei einer Endopeptidase Inhibition von 50 % [µg/mL]	Molares Verhältnis scFv-Fc:Toxin
BoNT/A1-L	SEM120-IIIC4	$1,5 \times 10^{-5}$	0,5:1
	SEM120-IID5	$4,0 \times 10^{-5}$	1,3:1
	SEM120-IIIC1	$1,5 \times 10^{-4}$	4,8:1
	SEM120-IE4	$6,0 \times 10^{-4}$	19,4:1
	SEM119-IE2	$2,0 \times 10^{-4}$	6,5:1
	SEM120-IVC5	$2,0 \times 10^{-4}$	6,4:1
	SEM95-C6	$7,0 \times 10^{-2}$	2.267,6:1
	SEM95-G8	$1,2 \times 10^{-2}$	386,7:1
	2H8	$2,0 \times 10^{-1}$	6.386,6:1
Rizin	43RCA	-	-

### 3.6.2 *Ex vivo Nervus phrenicus hemidiaphragma* Assay

Zur Validierung des Endopeptidase Immunassays wurden die 8 besten scFv-Fc-Antikörper, welche die Endopeptidase Aktivität von BoNT/A1 *in vitro* inhibierten, für ein *ex vivo* Neutralisationsassay verwendet. Hierbei wurde eine Präparation des *Nervus phrenicus hemidiaphragma* mit BoNT/A1 (87 pg/mL; 20LD<sub>50</sub>/mL) behandelt und die Muskelparalyse über die Zeit gemessen. Die Antikörperkonzentration der 8 unterschiedlichen scFv-Fc betrug während des Neutralisationsassays jeweils 30 µg/mL (Abbildung 3.7). Dies ermöglichte den direkten Vergleich der Effektivität bezüglich der Toxin-Neutralisation. Als zusätzliche Positiv-Kontrolle wurde ein polyklonales, trivalentes Pferde F(ab')<sub>2</sub> Serum verwendet sowie als Negativ-Kontrolle der anti-Rizin Antikörper 43RCA. Der anti-BoNT/A1-L Antikörper 2H8 wurde nicht für weitere Neutralisationsstudien benutzt, da dieser bereits in einer vorherigen Studie keinen neutralisierenden Effekt aufwies. Von den getesteten scFv-Fc wurde die Zeit bestimmt, bei der 50 % der durch BoNT/A1 verursachten Paralyse hervorgerufen wurde (Tabelle 3.4). Die 50 % Paralysezeit von BoNT/A1 betrug ohne zusätzliche Antikörper 98 min (Abbildung 3.7, A).



**Abbildung 3.7: Ex vivo Nervus phrenicus hemidiaphragma Assay.** **A)** Paralyse des Nervus phrenicus hemidiaphragma hervorgerufen durch BoNT/A1 (87 pg/mL; 20LD<sub>50</sub>/mL). **B)** Neutralisation von BoNT/A1 (87 pg/mL; 20LD<sub>50</sub>/mL) durch 30 µg/mL scFv-Fc. Als Positiv-Kontrolle wurde polyklonales, trivalentes Pferde F(ab')<sub>2</sub> Serum verwendet sowie als Negativ-Kontrolle der anti-Rizin Antikörper 43RCA als scFv-Fc. (Durchgeführt vom National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC), UK)

Die Negativ-Kontrolle 43RCA führte zu einer beschleunigten Paralyse gegenüber der alleinigen Toxingabe. Von den 8 getesteten scFv-Fc-Antikörpern führten 7 zu einer Neutralisation der BoNT/A1 assoziierten Toxizität. Von den 7 neutralisierenden Antikörpern besaß lediglich SEM120-IVC5, mit einer 50 % Paralysezeit von 116 min, eine schwache Toxin-Neutralisation. Die drei Antikörper mit der besten Toxin-Neutralisation waren SEM120-IID5, SEM120-IIIC1 und SEM120-IIIC4 mit einer 50 % Paralysezeit von jeweils 202 min, 201 min und 188 min. Von den BoNT/A1 spezifischen Antikörpern besaß nur SEM95-C6 mit einer 50 % Paralysezeit von 90 min keinen neutralisierenden Effekt (Tabelle 3.4).

**Tabelle 3.4: *Ex vivo Nervus phrenicus hemidiaphragma Assay*.** Die 50 % Paralysezeit [min] von BoNT/A1 (87 pg/mL; 20LD<sub>50</sub>/mL) mit den jeweiligen anti-BoNT/A1-L Antikörpern als scFv-Fc und der Negativ-Kontrolle (anti-Rizin, 43RCA).

Antigen	scFv-Fc	50 % Paralysezeit [min]
BoNT/A1-L	SEM120-IID5	202
	SEM120-IIIC1	200
	SEM120-IIIC4	188
	SEM95-G8	181
	SEM120-IE4	173
	SEM119-IE2	164
	SEM120-IVC5	116
	SEM95-C6	90
Rizin	43RCA	76

### 3.7 Charakterisierung der neutralisierenden sowie inhibitorischen scFv-Fc-Antikörper gegen BoNT/A1

#### 3.7.1 Affinitätsbestimmung mittels Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie

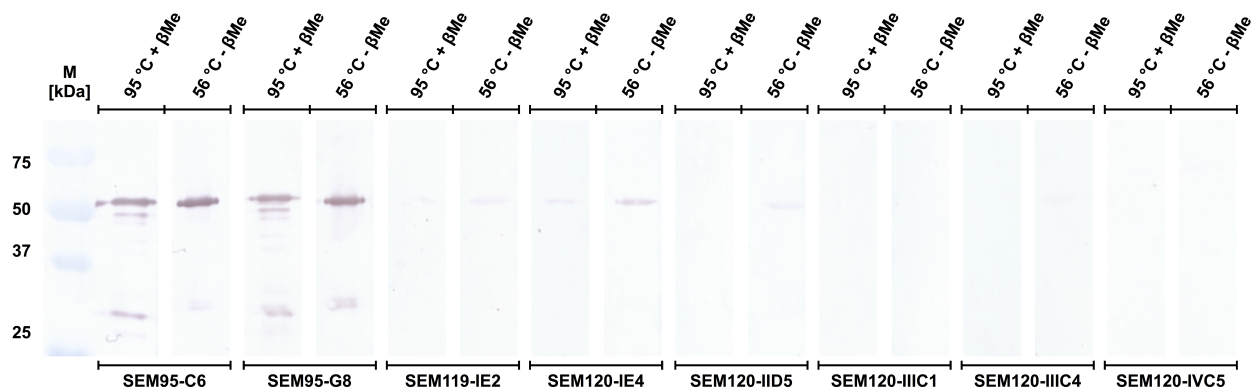
Die Bestimmung der Bindungsparameter der jeweiligen Antikörper zu BoNT/A1 wurde mittels der Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (SPR-Spektroskopie) in einer Biacore X Apparatur durchgeführt (*Le centre de recherches du service de santé des armées* (CRSSA)). Diese Methode ermöglicht den kinetischen Bindungsverlauf zwischen Antikörper und BoNT ohne zusätzliche Nachweisreagenzien zu verfolgen. Des Weiteren lässt sich aus der daraus resultierenden Assoziationsrate  $k_{\text{off}}$  sowie Dissoziationsrate  $k_{\text{on}}$  die Dissoziationskonstante  $K_D$  berechnen. Die Bindung einer mobilen Phase (Analyt) an einem immobilisierten Liganden führt zur Änderung des Brechungsindex und wird in Echtzeit als Resonanzeinheit (RU) gemessen. Für die Affinitätsbestimmungen wurden die jeweiligen Antikörper als scFv-Fc mittels Amin-Kopplung an die Oberfläche eines CM5-Chips immobilisiert. Die darauffolgenden Messungen wurden mit 6 Verdünnungen von BoNT/A1 (0,16  $\mu\text{M}$  bis 5 nM) in HBS-EP Puffer bei einer Flussrate von 30  $\mu\text{L}/\text{min}$  durchgeführt. Die Assoziationszeit betrug für jede Verdünnung 250 s sowie 750 s für die Dissoziationszeit. Auftretende Puffereffekte wurden durch die Messung einer Referenzzelle kompensiert. Die ermittelte Dissoziationskonstante  $K_D$  der jeweiligen Antikörper lag zwischen 0,76 nM und 4,47 nM. Für drei Antikörper (SEM119-IE2, SEM120-IE4 und SEM120-IID5) konnte aus dem Bindungsverlauf keine  $K_D$  berechnet werden (Tabelle 3.5).

**Tabelle 3.5: Affinitätsbestimmung der BoNT/A1 inhibierenden scFv-Fc-Antikörper mittels SPR-Spektroskopie.** Darstellung der Assoziationsrate  $k_{\text{off}}$  [ $\text{s}^{-1}$ ], Dissoziationsrate  $k_{\text{on}}$  [ $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ] sowie der Dissoziationskonstante  $K_D$  [nM]. (Durchgeführt vom *Le centre de recherches du service de santé des armées* (CRSSA), Frankreich)

Antikörper	$k_{\text{off}}$ [ $\text{s}^{-1}$ ]	$k_{\text{on}}$ [ $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ]	$K_D$ [nM]
SEM95-C6	$7,27 \times 10^{-5}$	$8,44 \times 10^4$	0,86
SEM95-G8	$1,41 \times 10^{-4}$	$3,15 \times 10^4$	4,47
SEM119-IE2	–	–	–
SEM120-IE4	–	–	–
SEM120-IID5	–	–	–
SEM120-IIIC1	$6,87 \times 10^{-5}$	$8,34 \times 10^4$	0,82
SEM120-IIIC4	$1,18 \times 10^{-4}$	$1,55 \times 10^5$	0,76
SEM120-IVC5	$6,99 \times 10^{-4}$	$4,90 \times 10^5$	1,43

### 3.7.2 Epitope-Charakterisierung der neutralisierenden sowie inhibitorischen scFv-Fc-Antikörper gegen BoNT/A1

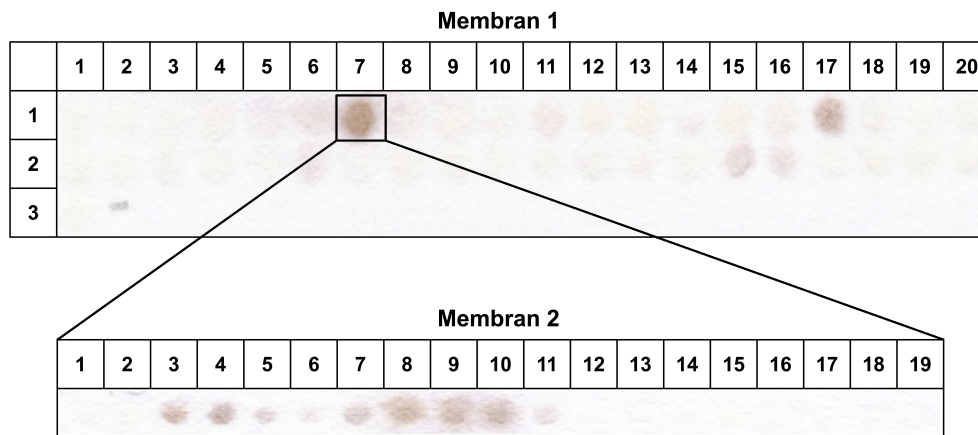
Für weiterführende Charakterisierungen wurden die 8 scFv-Fc-Antikörper, welche die Endopeptidase Aktivität von BoNT/A1 inhibieren beziehungsweise die Toxizität neutralisieren, mittels Western Blot und anschließender Immunfärbung untersucht (Abbildung 3.8). Dies diente der Spezifizierung, ob diese Antikörper ein kontinuierliches oder diskontinuierliches Epitop binden. Hierfür wurde zunächst eine SDS-PAGE mit rekombinanter leichter Kette von BoNT/A1 unter reduzierenden (Laemmli-Puffer mit  $\beta$ -Mercaptoethanol ( $\beta$ Me), 95 °C) sowie nicht-reduzierenden Bedingungen (Laemmli-Puffer ohne  $\beta$ Me, 56 °C) durchgeführt. Anschließend wurde die Proteine aus dem SDS-PA-Gel auf eine PVDF-Membran übertragen und mit 5  $\mu\text{g/mL}$  scFv-Fc-Antikörper inkubiert. Die Detektion der scFv-Fc erfolgte mittels anti-Maus Fc-spezifischen Antikörperkonjugat. Eine SDS-PAGE unter nicht-reduzierenden Bedingungen ermöglichte im Anschluss den Nachweis der meisten diskontinuierlichen Epitope, während unter reduzierenden Bedingungen die Detektion kontinuierlicher Epitope ermöglicht wurde. Zwei Antikörper, SEM95-C6 und SEM95-G8, haben BoNT/A1-L sowohl unter nicht-reduzierenden als auch reduzierenden Bedingungen gebunden. Ebenfalls, wenn auch mit schwächerer Intensität, hat SEM120-IE4 die unter reduzierenden Bedingungen denaturierte leichte Kette von BoNT/A1 gebunden.



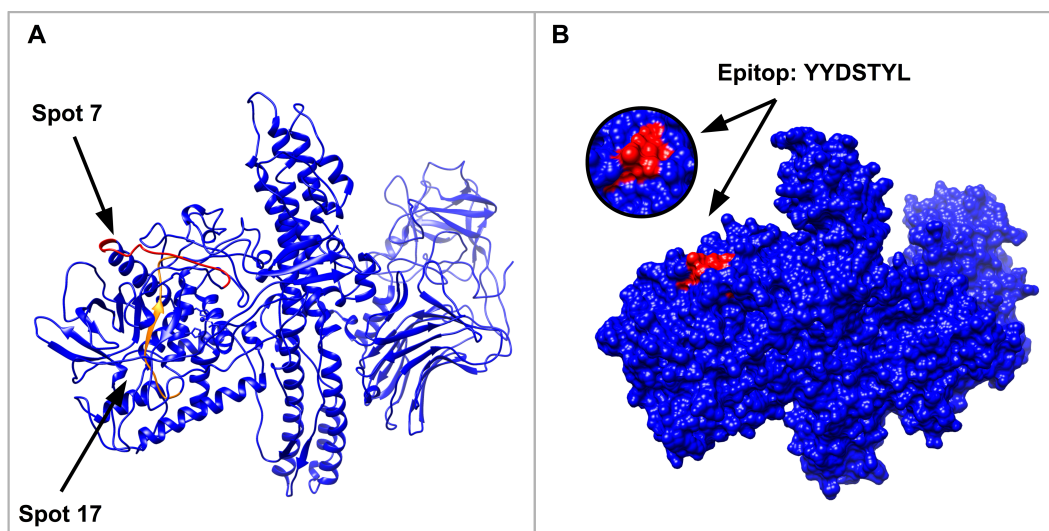
**Abbildung 3.8: Epitop-Charakterisierung der Endopeptidase Aktivität von BoNT/A1 inhibierenden Antikörper.** Die SDS-PAGE mit anschließendem Western Blot und Immunfärbung wurde mit rekombinanter leichter Kette von BoNT/A1 unter reduzierenden (Laemmli-Puffer mit  $\beta$ -Mercaptoethanol, 95 °C) sowie nicht-reduzierenden Bedingungen (Laemmli-Puffer ohne  $\beta$ -Mercaptoethanol, 56 °C) durchgeführt. Die Detektion erfolgte mit 5  $\mu$ g/mL scFv-Fc und Ziege anti-Maus Fc-spezifischen AP-konjugiertem Sekundärantikörper (1:20.000).

### 3.7.3 Epitop-Kartierung von SEM95-C6

Basierend auf den Ergebnissen der Epitop-Charakterisierung der 8 Antikörper, welche *in vitro* die Endopeptidase Aktivität von BoNT/A1 inhibierten, wurde für SEM95-C6 eine Epitop-Kartierung durchgeführt. Hierbei handelt es sich um einen nicht-neutralisierenden Antikörper. Informationen über neutralisierenden Epitopen dürfen aufgrund von Sicherheitsbestimmungen der EU nicht publiziert werden, da minimale Veränderungen der AS-Sequenz von BoNT dazu führen könnten, dass neutralisierende Antikörper nicht mehr binden. Die Epitop-Kartierung von SEM95-C6 erfolgte mittels einer Peptid-Membran mit sich überlappenden Peptiden von 15 AS Länge und einem *Offset* von 4 AS. Diese Membran diente der Analyse der gesamten Sequenz der leichten Kette von BoNT/A1 (Abbildung 3.9, Membran 1). Zwei nicht homologe Regionen von BoNT/A1-L (Spot 7; VPVSYYDSTYLSTDN und Spot 17; NGYGSTQYIRFSPDF) wurden als mögliche Epitope von SEM95-C6 identifiziert. Die für die Strukturanalyse verwendete pdb-Datei 3BTA (Lacy *et al.*, 1998) ergab, dass Spot 7 als mögliches Epitop auf der Oberfläche von BoNT/A1 vorliegt und Spot 17 ein Teil der inneren Struktur von BoNT/A1 darstellt (Abbildung 3.10, A). Für eine detailliertere Auflösung des Epitops wurde eine zweite Peptid-Membran aus sich überlappenden Peptiden von 9 AS Länge benutzt. Die auf der Membran befindlichen Peptide waren jeweils um eine AS versetzt (Abbildung 3.9, Membran 2). Anhand der zweiten Peptid-Membran wurde ein 7 AS langes Epitop (YYDSTYL) auf der Oberfläche von BoNT/A1 (Position 71-78) identifiziert (Abbildung 3.10, B).



**Abbildung 3.9: Epitop-Kartierung von SEM95-C6.** Für die Epitop-Kartierung wurden 2 Peptid-Membranen mit sich überlappenden Peptiden der leichten Kette von BoNT/A1 verwendet und mit 10 µg/mL Antikörper (scFv-Fc) inkubiert. Die Detektion gebundener Antikörper erfolgte mittels Ziege anti-Maus (Fc-spezifisch) HRP-konjugiertem Detektionsantikörper (1:20.000) und DAB-Färbung. Membran 1 umfasste die komplette Sequenz der leichten Kette von BoNT/A1 mit sich überlappenden Peptiden a 15 AS. Membran 2 bestand aus 9 AS langen Peptiden mit jeweils einer AS Versatz.

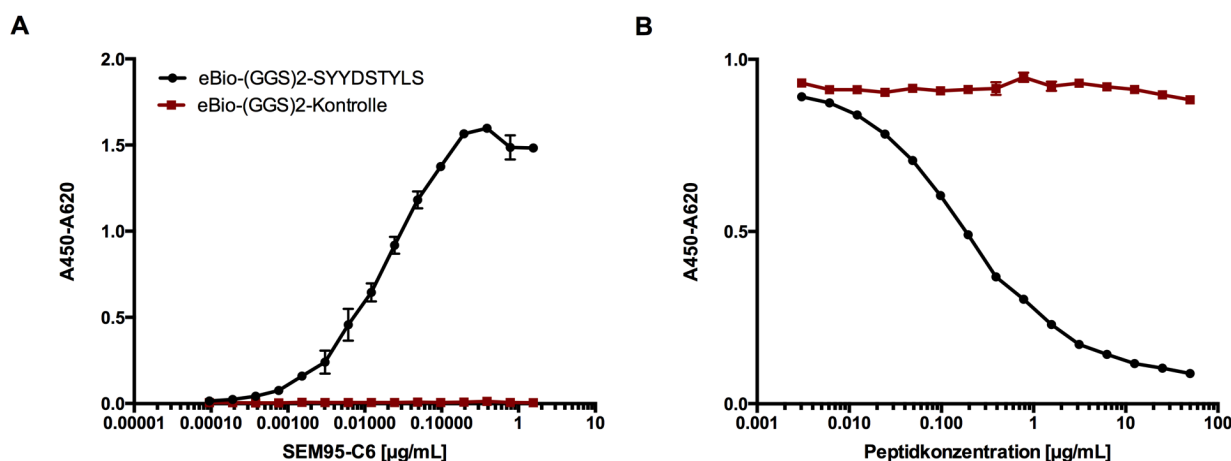


**Abbildung 3.10: Struktur von Botulinum Neurotoxin (pdb Struktur 3BTA).** A) Position von Spot 7 (Rot) und Spot 17 (Orange) innerhalb der Struktur von BoNT/A1. B) Identifiziertes Epitop von SEM95-C6 auf der Oberfläche von BoNT/A1 an Position 71-78.

Für die Epitop-Validierung wurde zusätzlich ein Antigen-ELISA auf biotinyliertem Peptid sowie ein Kompetitions-ELISA durchgeführt (Abbildung 3.11, A und B). Für den Antigen-ELISA wurden je Kavität 200 ng biotinyliertes Peptid (eBio-(GGs)2-SYYDSTYLS sowie Kontroll-Peptid (eBio-(GGs)2-GGSGGSDHQMNHSM DAGSPNLSPNPM, SMAD3)) über Streptavidin immobilisiert und für eine Titrationsreihe von SEM95-C6 (scFv-Fc) verwendet (Abbildung 3.11, A). SEM95-C6 hat lediglich das biotinylierte Peptid (eBio-(GGs)2-SYYDSTYLS) mit einem EC<sub>50</sub>-Wert von 25 ng/mL gebunden und wies keine Bindung zu dem Kontroll-Peptid auf. Basierend auf den Ergebnis des Antigen-ELISAs mit biotinyliertem Peptid wurden 25 ng/mL SEM95-C6 für einen kompetitiven



ELISA auf 100 ng immobilisiertem BoNT/A1-L eingesetzt. Die Konkurrenz erfolgte mit unterschiedlichen Konzentrationen an biotinyliertem Peptid (eBio-(GGs)2-SYYDSTYLS) im Überstand (Abbildung 3.11, B). Eine 50 %-ige Konkurrenz mit dem biotinylierten Peptid (eBio-(GGs)2-SYYDSTYLS) wurde bei einer Konzentration von  $\sim 0,11 \mu\text{g/mL}$  erzielt, während mit dem Kontroll-Peptid keine Konkurrenz erreicht wurde.

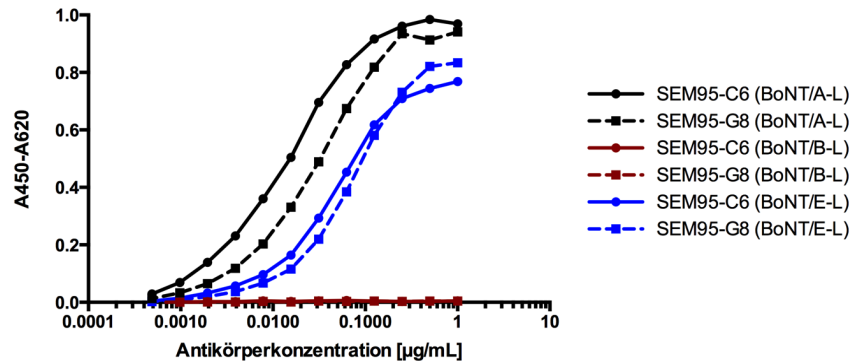


**Abbildung 3.11: Epitop-Validierung von SEM95-C6. A)** Antigen-ELISA von SEM95-C6 auf biotinyliertem Peptid. Je Kavität wurden 200 ng Peptid (eBio-(GGs)2-SYYDSTYLS sowie Kontroll-Peptid (eBio-(GGs)2-GGSGGSDHQMNHSM DAGSPNLSPNPM)) immobilisiert und mit einer Verdünnungsreihe von SEM95-C6 inkubiert. Die Detektion erfolgte mittels Ziege anti-Maus (Fc-spezifisch) HRP-konjugiertem Sekundärantikörper (1:20.000) und TMB-Färbung. **B)** Kompetitions-ELISA von SEM95-C6. Je Kavität wurden 100 ng rekombinante leichte Kette von BoNT/A1 immobilisiert und mit 25 ng/mL SEM95-C6 sowie einer Verdünnungsreihe von eBio-(GGs)2-SYYDSTYLS inkubiert.

### 3.7.4 Kreuzreaktivität von SEM95-C6 und SEM95-G8 mit Botulinum Neurotoxin Serotyp B und Serotyp E

Aus ökonomischer Sicht sind für therapeutische sowie diagnostische Applikationen Antikörper interessant, welche eine Kreuzreaktivität mit mehreren Serotypen von BoNT aufweisen. Aufgrund von homologen Bereichen innerhalb der Serotypen A, B und E, welche die Epitope von SEM95-C6 und SEM95-G8 widerspiegeln, wurden diese Antikörper für Kreuzreaktivitäts-Tests verwendet. Beide Antikörper wurden im Titrations-ELISA gegen die jeweiligen BoNT Serotypen getestet (Abbildung 3.12). Pro Kavität wurden je 100 ng rekombinante leichte Kette von Serotyp A, B oder E immobilisiert und eine Verdünnungsreihe von SEM95-C6 und SEM95-G8 aufgetragen. Sowohl SEM95-C6 als auch SEM95-G8 haben im Titrations-ELISA die leichte Kette von Serotyp A und E, jedoch nicht von Serotyp B gebunden. Des Weiteren wurde zur Validierung des Titrations-ELISAs die Affinität von SEM95-C6 und SEM95-G8 zu BoNT/A/B und E mittels SPR-Spektroskopie ermittelt. Die Affinität von SEM95-C6 und SEM95-G8 betrug 0,86 nM und 4,47 nM (BoNT/A1)

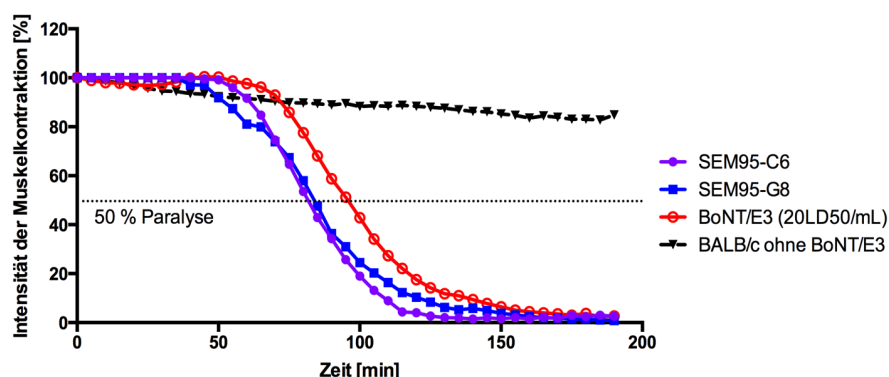
beziehungsweise 10,1 nM und 8,2 nM (BoNT/E3). Für BoNT/B konnte keine Affinitätsbestimmung vorgenommen werden.



**Abbildung 3.12: Titrations-ELISA von SEM95-C6 und SEM95-G8 auf Botulinum Neurotoxin Serotyp A/B und E.** Eine Verdünnungsreihe von SEM95-C6 und SEM95-G8 als scFv-Fc-Antikörper wurden je mit 100 ng immobilisiertem Antigen (rekombinante leichte Kette von BoNT/A/B und E) inkubiert und die Bindung mittels Ziege anti-Maus (Fc-spezifisch) HRP-konjugiertem Sekundärantikörper (1:20.000) und TMB-Färbung detektiert.

### 3.7.5 *Ex vivo Nervus phrenicus hemidiaphragma* Assay von SEM95-C6 und SEM95-G8

Vorherige Neutralisationsassays mit BoNT/A1 (87 pg/mL; 20LD<sub>50</sub>/mL) ergaben für SEM95-C6 und SEM95-G8 bei einer Konzentration von 30 µg/mL (scFv-Fc) eine 50 % Paralysezeit von 90 min (SEM95-C6) und 181 min (SEM95-G8). Die 50 % Paralysezeit von BoNT/A1 betrug hingegen 98 min. Somit hatte SEM95-G8 die Toxizität von BoNT/A1 im *ex vivo* Assay neutralisiert. Da sowohl SEM95-C6 als auch SEM95-G8 BoNT/A1 und BoNT/E3 binden, wurde eine Mögliche Kreuzneutralisation von BoNT/E3 analysiert. Die Neutralisation von BoNT/E3 wurde mittels *ex vivo Nervus phrenicus hemidiaphragma* Assay untersucht. Hierbei wurde eine Präparation des *Nervus phrenicus hemidiaphragma* mit BoNT/E3 (330 pg/mL; 20LD<sub>50</sub>/mL) sowie 30 µg/mL scFv-Fc-Antikörper behandelt und die Paralysezeit gemessen (Abbildung 3.13). Als weitere Kontrolle wurde eine Toxin-unbehandelte Präparation von BALB/c Mäusen verwendet. Die 50 % Paralysezeit der *Nervus phrenicus hemidiaphragma* Präparation, welche mit BoNT/E3 (330 pg/mL; 20LD<sub>50</sub>/mL) behandelt wurde, betrug 95 min (Tabelle 3.6). Hingegen betrug die 50 % Paralysezeit von BoNT/E3 mit den beiden Antikörpern SEM95-C6 und SEM95-G8 etwa 82 min sowie 83 min.



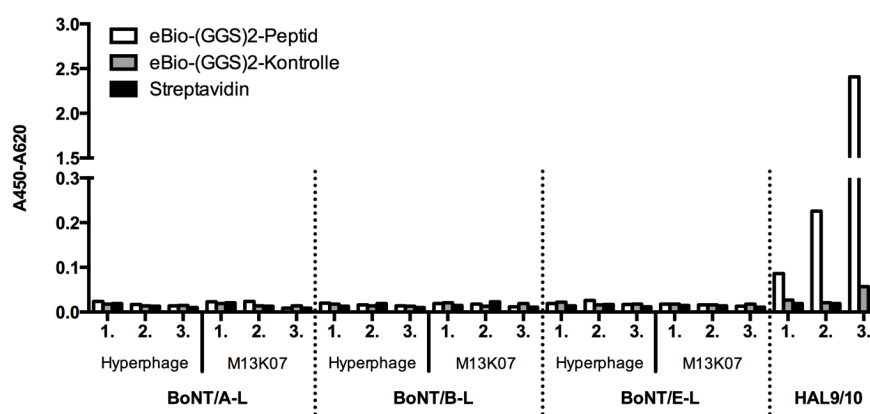
**Abbildung 3.13 Ex vivo Nervus phrenicus hemidiaphragma Assay.** Neutralisation von BoNT/E3 (330 pg/mL; 20LD<sub>50</sub>/mL) durch SEM95-C6 und SEM95-G8 (30 µg/mL scFv-Fc). Als Kontrolle wurde die Paralyse der Nervus phrenicus hemidiaphragma Präparationen von BALB/c Mäusen mit und ohne BoNT/E3 über die Zeit gemessen.

**Tabelle 3.6: Ex vivo Nervus phrenicus hemidiaphragma Assay.** Die 50 % Paralysezeit [min] von BoNT/A1 (87 pg/mL; 20LD<sub>50</sub>/mL) sowie BoNT/E3 (330 pg/mL; 20LD<sub>50</sub>/mL) mit und ohne Zugabe von SEM95-C6 und SEM95-G8 als scFv-Fc-Antikörper (30 µg/mL).

scFv-Fc	50 % Paralysezeit [min]	
	BoNT/A1	BoNT/E3
SEM95-C6	90	82
SEM95-G8	181	83
Toxin ohne Antikörper	98	95

### 3.8 Selektion von kreuzreaktiven scFv-Antikörper gegen die leichte Kette von Botulinum Neurotoxin Serotyp A/B/E mittels HAL9/10 und Immunbibliotheken

Für die Selektion von scFv-Antikörpern, welche die leichte Kette von Botulinum Neurotoxin Serotyp A/B und E binden, wurde zuvor ein Sequenzvergleich der drei Serotyp A, B und E vorgenommen und ein Bereich mit hoher Homologie auf der Toxinoberfläche ausgewählt. Die anschließende Antikörperselektion erfolgte auf biotinyliertem Peptid (FNYKDPVN, Sequenz von BoNT/A1-L) mit drei unterschiedlichen Immunbibliotheken gegen die leichte Kette von BoNT/A/B und E (Hyperphage und M13K07 verpackt) sowie der humanen naiven Antikörpergenbibliothek HAL9/10 (Kügler *et al.*, *in preparation*) (Hyperphage verpackt). Nach der dritten Selektionsrunde wurden, je nach verwendeter Antikörpergenbibliothek, zwischen  $4,8 \times 10^4$  (anti-BoNT/A1-L, M13K07) und  $2,1 \times 10^6$  (HAL9/10, Hyperphage) scFv-Phagen isoliert (Tabelle 3.7). Die Anreicherung spezifischer scFv-Phagen nach jeder Selektionsrunde wurde mittels polyklonalen Phagen-ELISA bestimmt (Abbildung 3.14).



**Abbildung 3.14: Polyklonaler Phagen-ELISA.** Mittels polyklonalen Phagen-ELISA wurde die Anreicherung spezifischer scFv-Phagen aus den Immunbibliotheken anti-BoNT/A-L, anti-BoNT/B-L, anti-BoNT/E-L sowie der humanen naiven Antikörpergenbibliothek HAL9/10 (Kügler *et al.*, *in preparation*) untersucht. Für den polyklonalen Phagen-ELISA wurden von den amplifizierten scFv-Phagen nach der 1., 2. und 3. Selektionsrunde  $5 \times 10^{11}$  scFv-Phagen verwendet und mit 200 ng immobilisiertem Antigen (biotinyliertes Peptid (eBio-(GGs)2-Peptid) sowie Kontroll-Peptid (eBio-(GGs)2-Kontrolle, Negativ-Kontrolle) und Streptavidin) inkubiert. Die Detektion erfolgte mittels Maus anti-M13 HRP-konjugiertem Sekundärantikörper (1:40.000) und anschließender TMB-Färbung.

Hierfür wurden die amplifizierten scFv-Phagen ( $5 \times 10^{11}$  cfu) nach jeder Selektionsrunde auf 200 ng biotinyliertem Peptid (eBio-(GGs)2-Peptid) sowie auf Kontroll-Peptid (eBio-(GGs)2-Kontrolle, Negativ-Kontrolle) und Streptavidin getestet. Während mit den Makaken Immunbibliotheken keine Anreicherung spezifischer scFv-Phagen erzielt wurde, war mit der naiven humanen Antikörpergenbibliothek HAL9/10 nach jeder Selektionsrunde eine deutliche Anreicherung spezifischer scFv-Phagen möglich. Zur Identifizierung spezifisch bindender scFv-Antikörper wurden nach der dritten Selektionsrunde von jeder Antikörpergenbibliothek 92 scFv-Klone für die Produktion löslicher scFv verwendet und mittels Antigen-ELISA analysiert. Insgesamt wurden 5 scFv aus der humanen naiven Antikörpergenbibliothek HAL9/10 isoliert und für weitere Charakterisierungen verwendet (Tabelle 3.7).

**Tabelle 3.7: Übersicht der eluierten Phagen.** Darstellung der eluierten Phagen [cfu] nach der 3. Selektionsrunde sowie die Anzahl der selektierten scFv-Antikörper.

Antikörpergenbibliothek	Verwendeter Helferphage	Eluierte Phagen [cfu] nach der 3. Selektionsrunde	Anzahl selektierter scFv
anti-BoNT/A-L	Hyperphage	$2,0 \times 10^6$	0
	M13K07	$4,8 \times 10^4$	0
anti-BoNT/B-L	Hyperphage	$1,7 \times 10^6$	0
	M13K07	$2,8 \times 10^5$	0
anti-BoNT/E-L	Hyperphage	$2,0 \times 10^5$	0
	M13K07	$2,5 \times 10^5$	0
HAL9/10	Hyperphage	$2,1 \times 10^6$	5

### 3.8.1 Sequenzanalyse der aus HAL9/10 selektierten scFv

Im Anschluss an die Sequenzierung der aus HAL9/10 selektierten scFv-Antikörper wurde die Analyse der VH und VL Regionen mit der Datenbank VBASE2 (Mollova *et al.*, 2010) durchgeführt (Tabelle 3.8). Dies diente der Bestimmung der CDRs und *framework* Regionen sowie der Identifizierung der Keimbahnlinien.

**Tabelle 3.8: Sequenzanalyse der aus HAL9/10 selektierten scFv.** Auflistung der identifizierten Keimbahnlinien für die VH und VL Regionen der selektierten scFv aus HAL9/10 (Kügler *et al.*, *in preparation*). Die Sequenzanalyse wurde mittels der Datenbank von VBASE2 durchgeführt.

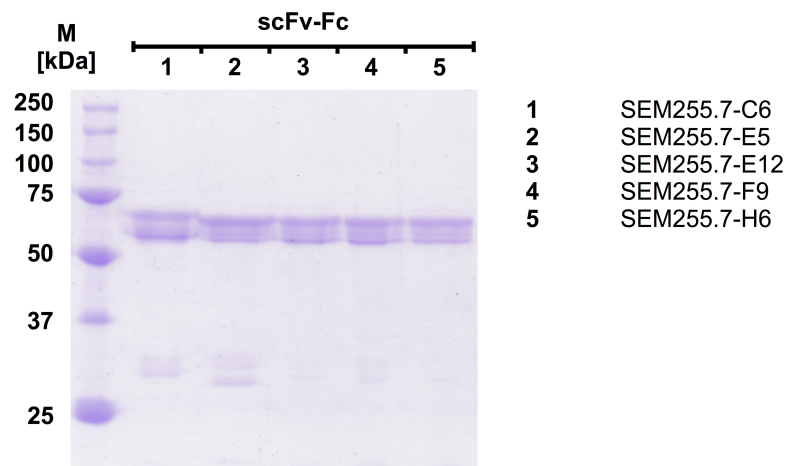
Antikörper- genbibliothek	scFv	VH			VL	
		V	D	J	V	J
HAL9/10	SEM253.7-C6	IGHV6-1*01	IGHD7-27*01	IGHJ4*02	IGLV1-47*01	IGLJ3*02
	SEM253.7-E5	IGHV6-1*01	IGHD7-27*01	IGHJ4*02	IGLV1-47*01	IGLJ3*02
	SEM253.7-E12	IGHV6-1*01	IGHD1-26*01	IGHJ4*02	IGLV1-47*01	IGLJ3*02
	SEM253.7-F9	IGHV6-1*01	IGHD5-12*01	IGHJ4*02	IGLV1-47*01	IGLJ3*02
	SEM253.7-H6	IGHV6-1*01	IGHD3-10*01	IGHJ3*02	IGLV1-47*01	IGLJ3*02

Die Analyse der VH Genfamilien ergab, dass sämtliche scFv die selbe V VH-Region (IGHV6-1\*01) in Verbindung mit den D VH-Regionen IGHD1, IGHD3, IGHD5 und IGHD7 beinhalteten. Die dominierende J VH-Region war IGHJ4, bis auf eine Ausnahme von IGHJ3. Die VL Genfamilien beschränkten sich auf die Kombination der selben V VL-Region (IGLV1-47\*01) und J VL-Region (IGLJ3\*02). Die Diversität der unterschiedlichen scFv bezog sich weitestgehend auf Unterschiede in der CDR3 der schweren Kette sowie einzelnen Aminosäuren in den *framework* Regionen von VH und VL.

### 3.8.2 Klonierung, Produktion und Reinigung aus der HAL9/10 selektierten scFv als scFv-Fc-Antikörper

Sämtliche aus der humanen Antikörpergenbibliothek HAL9/10 selektierten scFv wurden für weitere Charakterisierungen als scFv-Fc-Antikörper produziert und mittels Protein A Affinitätschromatographie gereinigt. Die eukaryotische Produktion erfolgte mit dem pCSE2.6-hIgG1-Fc-XP Expressionsvektor (Jäger *et al.*, 2013). Alle 5 Antikörper wurden erfolgreich als scFv-Fc produziert und die Konzentration nach der Affinitätschromatographie photometrisch mittels dem NanoDrop1000 System bestimmt. Anschließend wurde der Reinheitsgrad mittels SDS-PAGE und

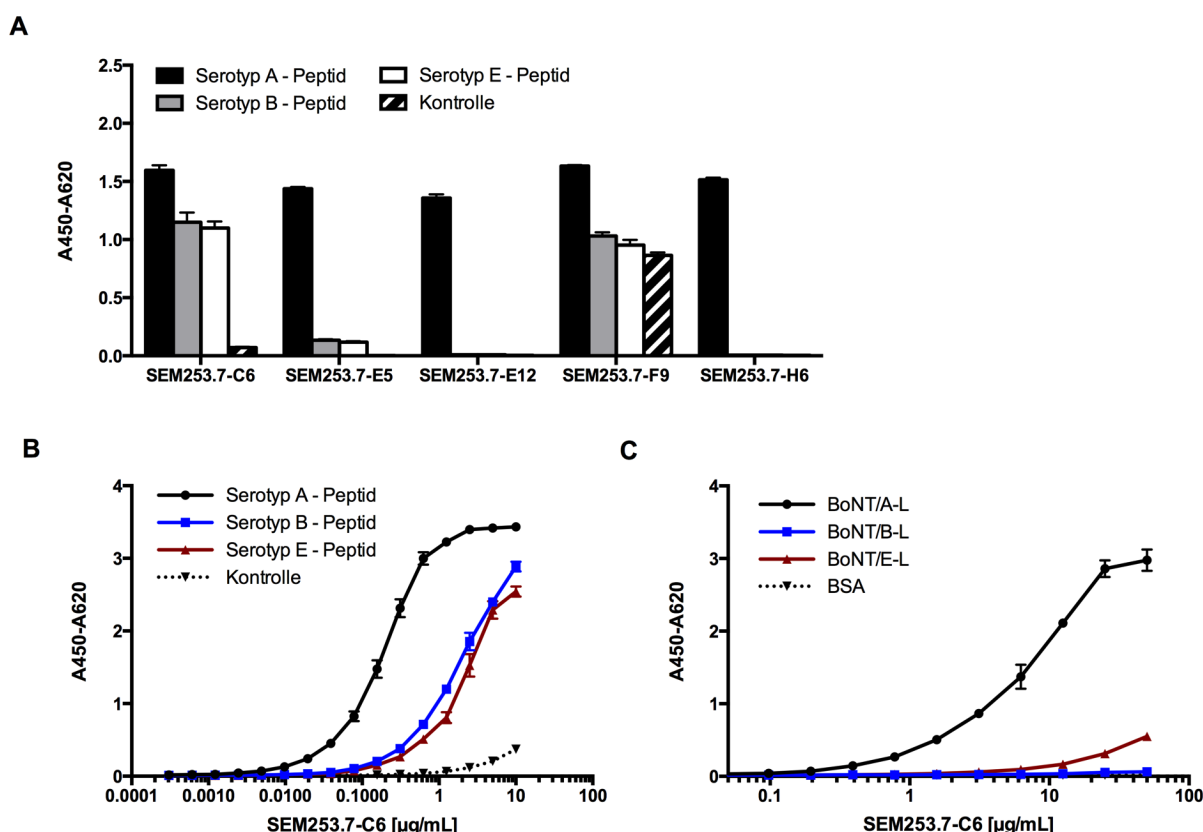
Coomassie-Färbung überprüft (Abbildung 3.15). Die scFv-Fc-Antikörper wurden in der SDS-PAGE zwischen 55 kDa und 70 kDa nachgewiesen. Zudem befanden sich bei ca. 30 kDa weitere Degradationsprodukte.



**Abbildung 3.15: SDS-PAGE mit den aus HAL9/10 selektierten Antikörper.** Zur Überprüfung des Reinheitsgrades der produzierten scFv-Fc wurde nach der Protein A Affinitätschromatographie mit je 1 µg scFv-Fc eine SDS-PAGE (12 %-igem PAA-Gel) unter reduzierenden Bedingungen (Laemmli-Puffer mit β-Mercaptoethanol, 95 °C) durchgeführt und anschließend mittels Coomassie-Färbung visualisiert.

### 3.8.3 Charakterisierung der aus HAL9/10 selektierten Antikörper

Zur Überprüfung der Kreuzreaktivität der aus HAL9/10 selektierten Antikörper mit BoNT Serotyp A/B und E wurden diese als scFv-Fc-Antikörper auf biotinyliertem Peptid (Serotyp A/B/E) sowie auf einem Kontroll-Peptid (KVQVSNPLLNPYKDV, Negativ-Kontrolle) mittels Antigen-ELISA getestet. Für den Antigen-ELISA wurden je 1 µg der scFv-Fc-Antikörper mit 200 ng immobilisiertem Antigen inkubiert. Von den 5 Antikörpern haben alle das Serotyp A-Peptid gebunden, jedoch wiesen nur SEM253.7-C6 und SEM253.7-F9 eine zusätzliche Bindung zu den Peptiden von Serotyp B und E auf. Von den beiden Antikörpern hat SEM253.7-F9 zusätzlich das Kontroll-Peptid gebunden und nur SEM253.7-C6 hat spezifisch die 3 Serotyp-Peptide gebunden (Abbildung 3.16, A). Weiterhin wurde die Spezifität von SEM253.7-C6 im Titrations-ELISA gegenüber den 3 unterschiedlichen Serotyp-Peptiden (Abbildung 3.16, B) sowie der jeweiligen leichten Kette von BoNT/A/B und E untersucht (Abbildung 3.16, C). SEM253.7-C6 hat im Titrations-ELISA die unterschiedlichen Peptide von BoNT/A/B und E gebunden, jedoch beschränkte sich die Bindung im ELISA gegen die rekombinanten leichten Kette von BoNT/A/B und E hauptsächlich auf BoNT/A-L. Ab einer Antikörperkonzentration von 10 µg/mL band SEM253.7-C6 ebenfalls BoNT/E-L, allerdings wurde unabhängig von der Antikörperkonzentration keine Bindung an BoNT/B-L sowie BSA (Negativ-Kontrolle) nachgewiesen (Abbildung 3.16, C).

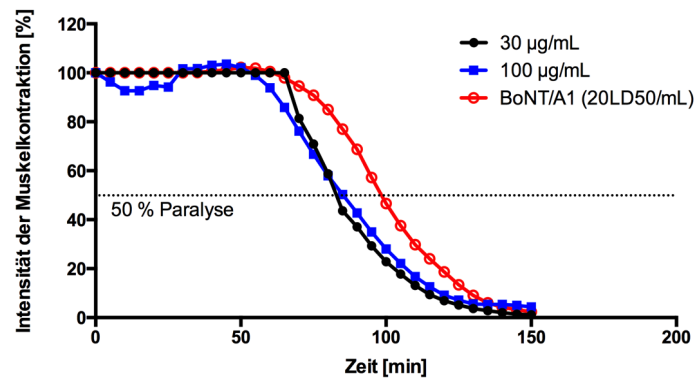


**Abbildung 3.16: Charakterisierung der aus HAL9/10 selektierten Antikörper als scFv-Fc-Antikörper.** **A)** Antigen-ELISA mit je 1 µg scFv-Antikörper auf 200 ng immobilisiertem Antigen (biotinyliertes Peptid der Serotypen A (FNYKDPVN), B (FNYNDPVD) und E (FNYNDPVN) sowie Kontroll-Peptid (Negativ-Kontrolle (KVQVSNPILLNPYKDV)). **B)** Titrations-ELISA von SEM253.7-C6 auf 200 ng immobilisiertem Antigen (biotinyliertes Peptid der Serotypen A/B/E sowie Kontroll-Peptid (Negativ-Kontrolle)). **C)** Titrations-ELISA von SEM253.7-C6 auf 200 ng immobilisiertes Antigen (rekombinante leichte Kette von BoNT Serotyp A/B/E sowie BSA (Negativ-Kontrolle)). Die Detektion erfolgte mittels Ziege anti-Human IgG (Fc-spezifisch) HRP-konjugiertem Sekundär-antikörper (1:70.000) und TMB-Färbung.

### 3.8.4 *Ex vivo Nervus phrenicus hemidiaphragma* Assay mit SEM253.7-C6

Die Toxin-neutralisierenden Eigenschaften des humanen Antikörpers SEM253.7-C6 wurden mittels dem *ex vivo Nervus phrenicus hemidiaphragma* Assay analysiert. Hierfür wurde eine Präparation des *Nervus phrenicus hemidiaphragma* mit BoNT/A1 (87 pg/mL; 20LD<sub>50</sub>/mL) sowie SEM253.7-C6 (30 µg/mL und 100 µg/mL) inkubiert und die 50 % Paralysezeit bestimmt (Abbildung 3.17). Die 50 % Paralysezeit mit SEM253.7-C6 betrug bei einer Antikörperkonzentration von 30 µg/mL in etwa 84 min beziehungsweise bei 100 µg/mL 85 min. Im Vergleich zur 50 % Paralysezeit von BoNT/A1 ohne zusätzlichen Antikörper (98 min) führte SEM253.7-C6 zu einer leicht beschleunigten Paralyse der *Nervus phrenicus hemidiaphragma* Präparation.

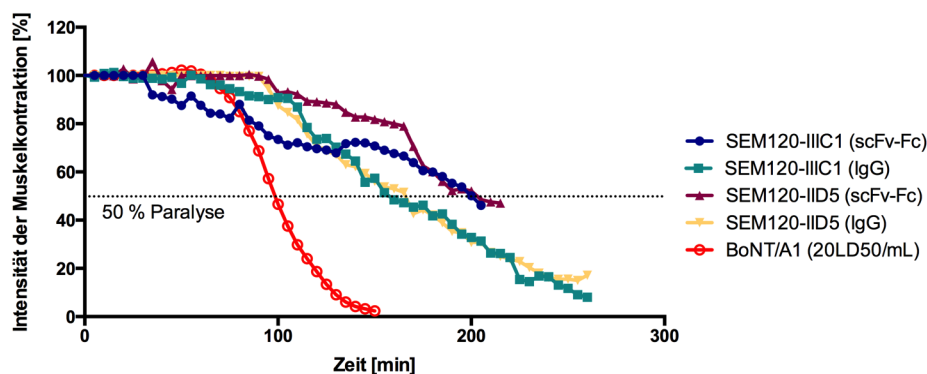




**Abbildung 3.17:** *Ex vivo Nervus phrenicus hemidiaphragma Assay* mit SEM253.7-C6. Neutralisation von BoNT/A1 (87 pg/mL; 20LD<sub>50</sub>/mL) durch SEM253.7-C6 als scFv-Fc-Antikörper (30 µg/mL und 100 µg/mL). Als Kontrolle für die Paralyse der *Nervus phrenicus hemidiaphragma* Präparationen wurde BoNT/A1 ohne Antikörper über die Zeit gemessen.

### 3.9 Humanisierung der BoNT/A1 neutralisierender Antikörper

Um eine potenzielle Immunogenität nicht-humaner Antikörper für therapeutische Zwecke im Menschen zu reduzieren, werden diese humanisiert. In den vorhergegangenen *ex vivo* Neutralisationsstudien erwiesen sich SEM120-IID5 und SEM120-IIIC1 gleichermaßen als potenzielle Kandidaten für eine Humanisierung um gegebenenfalls als therapeutischer Antikörper verwendet werden zu können. Die Entscheidung, welcher Antikörper für die Humanisierung verwendet wurde, basierte auf den Ergebnissen des *ex vivo Nervus phrenicus hemidiaphragma* Assays, bei dem die Toxin-Neutralisation beider Antikörper als scFv-Fc und IgG miteinander verglichen wurde (Abbildung 3.18).



**Abbildung 3.18:** *Ex vivo Nervus phrenicus hemidiaphragma Assay* von SEM120-IID5 und SEM120-IIIC1 als scFv-Fc und IgG. Neutralisation von BoNT/A1 (87 pg/mL; 20LD<sub>50</sub>/mL) durch SEM120-IID5 und SEM120-IIIC1 als scFv-Fc (30 µg/mL, 267 nM) und IgG (40 µg/mL, 267 nM). Als Kontrolle für die Paralyse der *Nervus phrenicus hemidiaphragma* Präparationen wurde BoNT/A1 ohne Antikörper über die Zeit gemessen.



Für einen direkten Vergleich der Antikörperformate wurden jeweils 267 nM scFv-Fc (30 µg/mL) beziehungsweise IgG (40 µg/mL) im *ex vivo Nervus phrenicus hemidiaphragma* Assay verwendet und die 50 % Paralysezeit bei einer Toxin-Konzentration (BoNT/A1) von 87 pg/mL (20LD<sub>50</sub>/mL) bestimmt (Tabelle 3.9). Die 50 % Paralysezeit von SEM120-IID5 und SEM120-IIIC1 betrug als scFv-Fc 202 min beziehungsweise 200 min, im IgG-Format reduzierte sich diese bei beiden Antikörpern auf 149 min und 159 min. Im Rahmen dieser Dissertation wurde exemplarisch der Makaken Antikörper SEM120-IIIC1 für die weiterführende Humanisierung verwendet.

**Tabelle 3.9: *Ex vivo Nervus phrenicus hemidiaphragma* Assay von SEM120-IID5 und SEM120-IIIC1 als scFv-Fc und IgG.** Die 50 % Paralysezeit [min] von BoNT/A1 (87 pg/mL; 20LD<sub>50</sub>/mL) mit den anti-BoNT/A1-L Antikörpern SEM120-IID5 und SEM120-IIIC1 als scFv-Fc und IgG.

Antikörper	scFv-Fc 50 % Paralysezeit [min]	IgG 50 % Paralysezeit [min]
SEM120-IID5	202	149
SEM120-IIIC1	200	159

### 3.9.1 Bestimmung der humanen Keimbahnliniengene mit der höchsten Homologie zu SEM120-IIIC1

Für die Humanisierung des Makaken Antikörpers SEM120-IIIC1 wurde die Aminosäuresequenz der leichten und schweren Kette mit denen der humanen Keimbahnliniengene verglichen und die Unterschiede in der Sequenz anhand der physikalisch-chemischen Eigenschaften der Aminosäuren bewertet (Tabelle 3.10). Der Vergleich der Aminosäuresequenzen erfolgte mittels IMGT/DomainGapAlign (<http://www.imgt.org>). Die Klassifizierung der Aminosäuren innerhalb der *framework* Regionen erfolgte anhand der IMGT Aminosäuren Klassen (Pommié *et al.*, 2004). Unterschiede in der Sequenz wurden in 'sehr ähnliche', 'ähnliche', 'unähnliche' und 'sehr unähnliche' Aminosäuren eingeteilt und jeweils für VH und VL separat behandelt (Tabelle 3.10). Innerhalb der *framework* Regionen der schweren Kette von SEM120-IIIC1 wurden 12 Aminosäuren identifiziert, welche von den humanen Keimbahnlinien mit der höchsten Übereinstimmung abwichen. Von den 12 Aminosäuren wurden wiederum 3 als 'ähnlich' (V21>L (FR1-IMGT), M39>I (FR2-IMGT), V87>A (FR3-IMGT)), 4 als 'unähnlich' (V5>E (FR1-IMGT), H40>T, I55>W (FR2-IMGT), Y88>F (FR3-IMGT)) und 5 als 'sehr unähnlich' (A17>T (FR1-IMGT), G49>V (FR2-IMGT), S66>D, S92>N (FR3-IMGT), T122>V (FR4-IMGT)) (Human > Makake) klassifiziert. Für die leichte Kette betrug die Abweichung 11 Aminosäuren, von denen 1 als 'sehr ähnlich' (I2>L (FR1-IMGT)), 5 als 'ähnlich' (D1>E, T22>S (FR1-IMGT), S69>T, V71>I (FR3-IMGT), V118>L (FR4-IMGT)), 2 als 'unähnlich' (S10>A (FR1-IMGT), N40>T (FR2-IMGT)) und 3 als 'sehr unähnlich' (S66>R, F99>S,

## Ergebnisse

T101>V (FR3-IMGT) eingestuft wurden. Mittels der Abweichung innerhalb der *framework* Regionen wurde der *Germinality Index* (GI) für VH und VL ermittelt. Dieser gibt die prozentuale Abweichung zu den humanen Keimbahnliniengenen (bezogen auf die *framework* Regionen) mit der höchsten Homologie zu SEM120-IIIC1 an und betrug für die schwere Kette 86,8 % sowie für die leichte Kette 87,6 %. Für VH und VL zusammen betrug der GI 87,2 %.

**Tabelle 3.10: Vergleich der humanen Keimbahnliniengene und SEM120-IIIC1.** Charakterisierung der Unterschiede zwischen den *framework* Regionen von SEM120-IIIC1 und denen der humanen Keimbahnlinien mit der höchsten Homologie zu SEM120-IIIC1 mittels IMGT/DomainGapAlign.

	Total (AS)	Übereinstimmung (AS)	Sehr ähnlich (+++)	Ähnlich (+-+), (++-)	Unähnlich (--+), (-+-), (+--)	Sehr unähnlich (---)
VH						
FR1-IMGT	25	22	0	1	1	1
FR2-IMGT	17	13	0	1	2	1
FR3-IMGT	38	34	0	1	1	2
FR4-IMGT	11	10	0	0	0	1
<b>FR-IMGT</b>	<b>91</b>	<b>79</b>	<b>0</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>
<b>Germinality Index (GI)</b>	<b>(%)</b>	<b>86,8 %</b>	<b>0,0 %</b>	<b>3,3 %</b>	<b>4,4 %</b>	<b>5,5 %</b>
V-KAPPA						
FR1-IMGT	26	22	1	2	1	0
FR2-IMGT	17	16	0	0	1	0
FR3-IMGT	36	31	0	2	0	3
FR4-IMGT	10	9	0	1	0	0
<b>FR-IMGT</b>	<b>89</b>	<b>78</b>	<b>1</b>	<b>5</b>	<b>2</b>	<b>3</b>
<b>Germinality Index (GI)</b>	<b>(%)</b>	<b>87,6 %</b>	<b>1,1 %</b>	<b>5,6 %</b>	<b>2,2 %</b>	<b>3,4 %</b>
<b>Alle FR-IMGT VH und V-KAPPA</b>	<b>180</b>	<b>157</b>	<b>1</b>	<b>8</b>	<b>6</b>	<b>8</b>
	<b>(%)</b>	<b>87,2 %</b>	<b>0,6 %</b>	<b>4,4 %</b>	<b>3,3 %</b>	<b>4,4 %</b>

### 3.9.2 Strukturmodellierung der humanisierten Varianten von SEM120-IIIC1

Basierend auf den Ergebnissen der IMGT/DomainGapAlign Analyse wurden für VH und VL jeweils unterschiedlich humanisierte Varianten erstellt, bei denen schrittweise die Aminosäuren in den *framework* Regionen ausgetauscht wurden. Für die unterschiedlichen Varianten wurden die 'sehr ähnlichen' und 'ähnlichen' Aminosäuren (Hu<sub>1</sub>VH, Hu<sub>1</sub>VL), die 'sehr ähnlichen', 'ähnlichen' und 'unähnlichen' Aminosäuren (Hu<sub>2</sub>VH, Hu<sub>2</sub>VL) beziehungsweise die 'sehr ähnlichen', 'ähnlichen', 'unähnlichen' und 'sehr unähnlichen' Aminosäuren (Hu<sub>3</sub>VH, Hu<sub>3</sub>VL) ausgetauscht und der

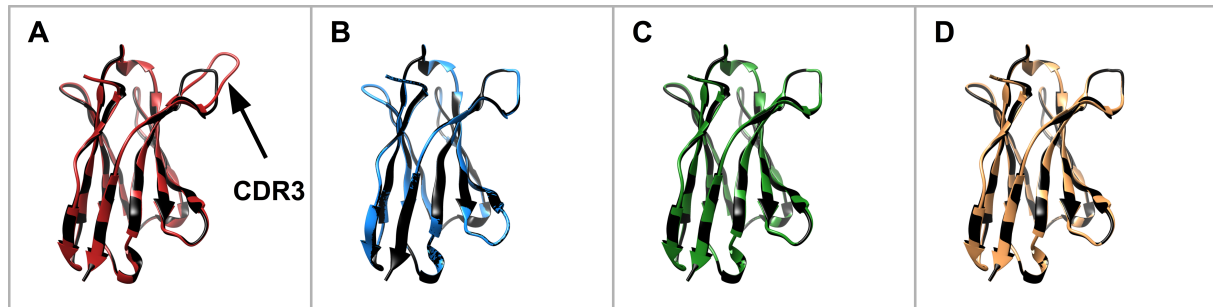
*Germinality Index* ermittelt (Tabelle 3.11). Die 3D Struktur der jeweiligen humanisierten VH und VL Varianten wurde mittels WAM (*Web Antibody Modelling*; <http://antibody.bath.ac.uk>) (Whitelegg & Rees, 2000) generiert und mit dem Programm Chimera (<http://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>) (Huang *et al.*, 2014) mit der 3D Struktur der Makaken VH und VL verglichen.

**Tabelle 3.11: Humanisierte Varianten von SEM120-IIIC1.** Darstellung der unterschiedlich humanisierten Varianten der leichten und schweren Kette von SEM120-IIIC1 sowie der dazugehörige *Germinality Index* (GI). Der GI wurde mittels IMGT/DomainGapAlign ermittelt und in Prozent [%] angegeben.

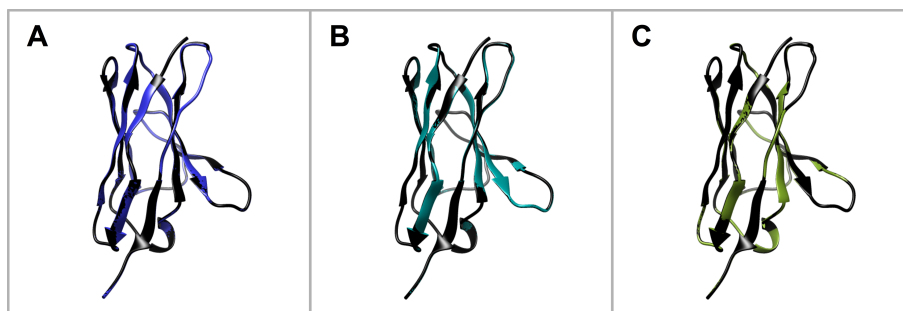
Schwere Kette		Leichte Kette	
Variante	<i>Germinality Index</i> [%]	Variante	<i>Germinality Index</i> [%]
VH	86,8	VL	87,6
Hu <sub>1</sub> VH (Hu <sub>1</sub> VH/V21>L)	90,1 (89,0)	Hu <sub>1</sub> VL	94,4
Hu <sub>2</sub> VH (Hu <sub>2</sub> VH/V21>L)	94,5 (93,4)	Hu <sub>2</sub> VL	96,6
Hu <sub>3</sub> VH (Hu <sub>3</sub> VH/V21>L)	100 (98,9)	Hu <sub>3</sub> VL	100

Die 3D Strukturanalyse von Hu<sub>1</sub>VH, bei der lediglich 3 'ähnliche' Aminosäuren ausgetauscht wurden, ergab im Vergleich zur der ursprünglichen VH eine strukturelle Änderung innerhalb der CDR3 (Abbildung 3.19, A). Daraufhin wurde V21>L (FR1-IMGT), M39>I (FR2-IMGT) und V87>A (FR3-IMGT) einzeln beziehungsweise in den jeweiligen Kombinationen zurück mutiert und eine erneute Strukturanalyse durchgeführt. Dabei erwies sich V21>L (FR1-IMGT) für die strukturelle Änderung in der CDR3 verantwortlich. Die humanisierte Variante Hu<sub>1</sub>VH/V21>L, bei der nur die beiden Aminosäuren M39>I (FR2-IMGT) und V87>A (FR3-IMGT) ausgetauscht wurden, besaß im Vergleich zur ursprüngliche Makaken VH eine identische 3 D Struktur (Abbildung 3.19, B). Für die humanisierten Varianten Hu<sub>2</sub>VH und Hu<sub>3</sub>VH wurde diese Änderung beibehalten (Hu<sub>2</sub>VH/V21>L und Hu<sub>3</sub>VH/V21>L) und eine erneute Strukturanalyse durchgeführt (Abbildung 3.19, C und D). Der Strukturabgleich von Hu<sub>2</sub>VH/V21>L und Hu<sub>3</sub>VH/V21>L mit der ursprünglichen Makaken VH ergab nur geringfügige Abweichungen am N-Terminus sowie in der CDR3. Die humanisierten VH-Varianten Hu<sub>1</sub>VH/V21>L, Hu<sub>2</sub>VH/V21>L und Hu<sub>3</sub>VH/V21>L wurden für die darauffolgenden Arbeiten verwendet und zudem deren *Germinality Index* bestimmt (Tabelle 3.11).

Für die humanisierten Varianten der leichten Kette (Hu<sub>1</sub>VL, Hu<sub>2</sub>VL und Hu<sub>3</sub>VL) wurde keine Strukturveränderung im Vergleich zu der ursprünglichen Makaken VL festgestellt (Abbildung 3.20, A-C). Sämtliche VL-Varianten (inklusive der Makaken VL) wurden in Kombination mit den humanisierten VH-Varianten sowie der ursprünglichen VH für die weitere Humanisierung verwendet.



**Abbildung 3.19: 3 D Strukturanalyse der humanisierten VH-Varianten von SEM120-IIIC1.** Vergleich der unterschiedlich humanisierten VH-Varianten von SEM120-IIIC1 mit der 3 D Struktur des ursprünglichen Makaken Antikörpers SEM120-IIIC1. Die 3 D Struktur wurde mittels WAM (*Web Antibody Modelling*; <http://antibody.bath.ac.uk>) erstellt. **A)** Vergleich von Hu<sub>1</sub>VH (Rot) mit der VH von SEM120-IIIC1 (Schwarz). **B)** Vergleich von Hu<sub>1</sub>VH/V21>L (Blau) mit der VH von SEM120-IIIC1 (Schwarz). **C)** Vergleich von Hu<sub>2</sub>VH/V21>L (Grün) mit der VH von SEM120-IIIC1 (Schwarz). **D)** Vergleich von Hu<sub>3</sub>VH/V21>L (Orange) mit der VH von SEM120-IIIC1 (Schwarz).

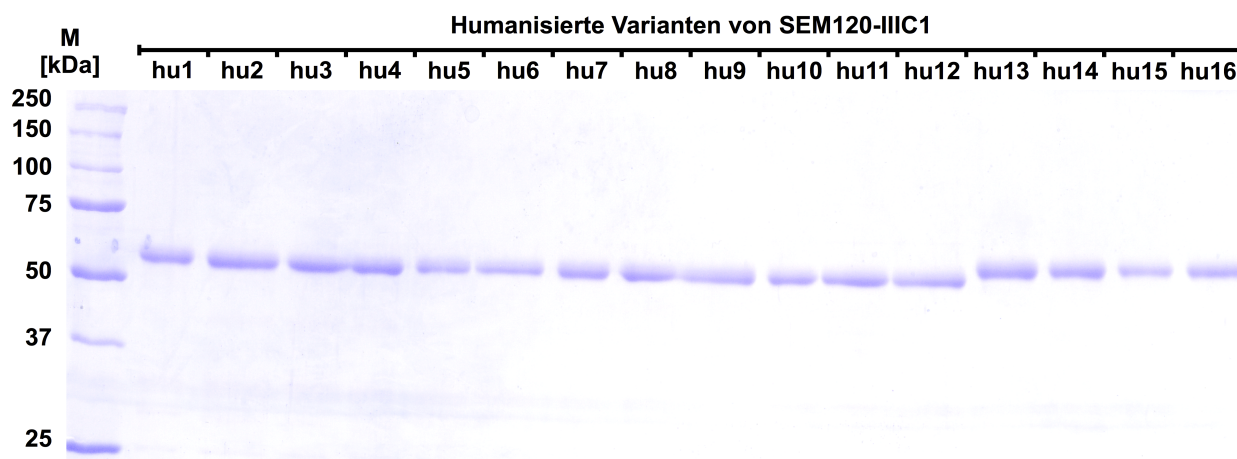


**Abbildung 3.20: 3 D Strukturanalyse der humanisierten VL-Varianten von SEM120-IIIC1.** Vergleich der unterschiedlich humanisierten VL-Varianten von SEM120-IIIC1 mit der 3 D Struktur des ursprünglichen Makaken Antikörpers SEM120-IIIC1. Die 3 D Struktur wurde mittels WAM (*Web Antibody Modelling*; <http://antibody.bath.ac.uk>) erstellt. **A)** Vergleich von Hu<sub>1</sub>VL (Blau) mit der VL von SEM120-IIIC1 (Schwarz). **B)** Vergleich von Hu<sub>2</sub>VL (Türkis) mit der VL von SEM120-IIIC1 (Schwarz). **C)** Vergleich von Hu<sub>3</sub>VL (Grün) mit der VL von SEM120-IIIC1 (Schwarz).

### 3.9.3 Klonierung, Produktion und Reinigung der humanisierten Varianten von SEM120-IIIC1 als scFv-Fc-Antikörper

Für weiterführende Analysen wurden die humanisierten Varianten der schweren und leichten Kette von SEM120-IIIC1 miteinander kombiniert und in den eukaryotischen Expressionsvektor pCSE2.5-mIgG2c-Fc-XP kloniert (Jäger *et al.*, 2013). Als scFv beinhaltete die schwere Kette von SEM120-IIIC1 einen Teil der Makaken C<sub>H1</sub> Region, welcher sich in einer Aminosäure von der humanen C<sub>H1</sub> Region unterschied. Dieser Teil wurde für die Produktion der humanisierten Varianten mit der humanen C<sub>H1</sub> Region ausgetauscht, sodass am Ende der Neukombination von VH und VL 16 humanisierte Varianten von SEM120-IIIC1 entstanden. Diese wurden als scFv-Fc-Antikörper in HEK293-6E produziert, via Protein A Affinitätschromatographie gereinigt und mittels SDS-PAGE sowie anschließender Coomassie-Färbung analysiert (Abbildung 3.21).

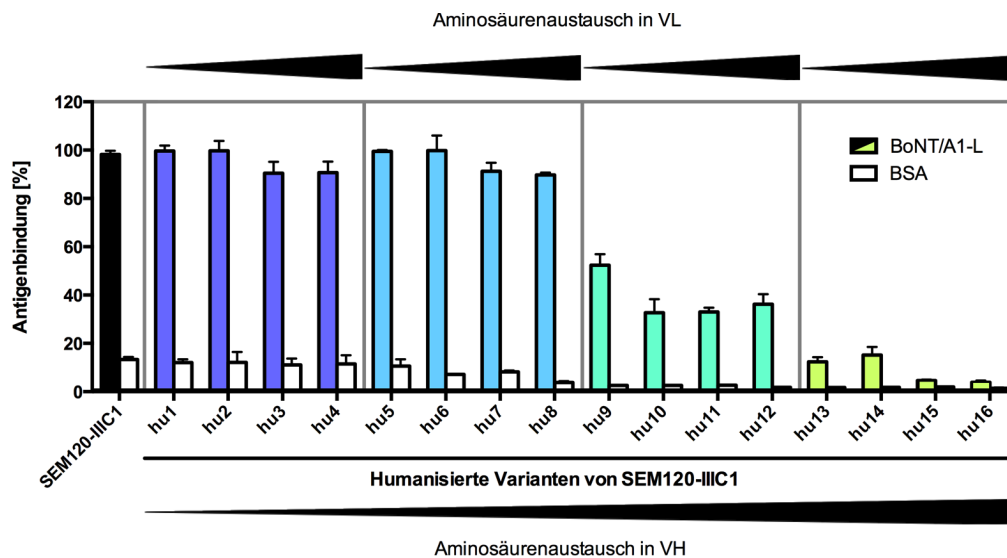
Unter reduzierenden Bedingungen liegen die scFv-Fc-Antikörper als Monomer mit einem Molekulargewicht von etwa 55 kDa vor. Die humanisierten Varianten hu1SEM120-IIIC1 bis hu12SEM120-IIIC1 besaßen in der SDS-PAGE ein identisches Laufverhalten. Während das Laufverhalten der Varianten hu13SEM120-IIIC1 bis hu16SEM120-IIIC1, welche über die selbe VH-Variante (Hu<sub>3</sub>VH/V21>L) verfügten, von den anderen Varianten geringfügig abwich und auf eine größere Molekularmasse deutete.



**Abbildung 3.21: SDS-PAGE der produzierten humanisierten Varianten von SEM120-IIIC1 als scFv-Fc-Antikörper.** Zur Überprüfung der Reinheit der produzierten scFv-Fc nach erfolgter Protein A Affinitätschromatographie wurde mit je 1 µg scFv-Fc eine SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen (Laemmli-Puffer mit β-Mercaptoethanol, 95 °C) mit einem 12 %-igem PAA-Gel durchgeführt und anschließend mittels Coomassie-Färbung visualisiert.

#### 3.9.4 Charakterisierung der humanisierten Varianten von SEM120-IIIC1

Um zu beurteilen, ob die humanisierten Varianten von SEM120-IIIC1 weiterhin spezifisch BoNT/A1-L binden, wurde ein Antigen-ELISA gegen die leichte Kette von BoNT/A1 durchgeführt. Hierfür wurden je 100 ng immobilisiertes Antigen mit 1 µg scFv-Fc inkubiert und mittels Ziege anti-Maus (Fc-spezifisch) HRP-konjugiertem Detektionsantikörper nachgewiesen. Die Antigenbindung der humanisierten Varianten wurde mit dem ursprünglichen Makaken Antikörper (SEM120-IIIC1 als scFv-Fc) verglichen und in Prozent angegeben (Abbildung 3.22).



**Abbildung 3.22: Antigen-ELISA der humanisierten Varianten von SEM120-IIIC1.** Je 1 µg der humanisierten Varianten von SEM120-IIIC1 (hu1SEM120-IIIC1 bis hu16SEM120-IIIC1) sowie der Makaken Antikörper SEM120-IIIC1 wurden als scFv-Fc mit 100 ng immobilisiertem Antigen (BoNT/A1-L) inkubiert. Die Detektion erfolgte mittels Ziege anti-Maus (Fc-spezifisch) HRP-konjugiertem Sekundärantikörper (1:20.000) und TMB-Färbung.

Die humanisierten Varianten hu1SEM120-IIIC1 bis hu8SEM120-IIIC1 wiesen im Antigen-ELISA eine zum ursprünglichen Makaken Antikörper vergleichbare Bindung zu BoNT/A1-L auf. Hierbei handelte es sich um Kombinationen der ursprünglichen VH (bis auf 1 AS-Austausch in C<sub>H1</sub>) von SEM120-IIIC1 mit den VL-Varianten VL, Hu<sub>1</sub>VL, Hu<sub>2</sub>VL und Hu<sub>3</sub>VL (hu1SEM120-IIIC1 bis hu2SEM120-IIIC1) sowie der VH-Variante Hu<sub>1</sub>VH/V21>L mit VL, Hu<sub>1</sub>VL, Hu<sub>2</sub>VL und Hu<sub>3</sub>VL (hu5SEM120-IIIC1 bis hu8SEM120-IIIC1). Des Weiteren wurde die Affinität zu BoNT/A1 von den Varianten hu1SEM120-IIIC1 bis hu8SEM120-IIIC1 mittels SPR-Spektroskopie bestimmt (Tabelle 3.12). Sämtliche humanisierten Varianten von SEM120-IIIC1 lagen mit einer K<sub>D</sub> von 0,89 nM (hu4SEM120-IIIC1) bis 1,99 nM (hu3SEM120-IIIC1) im Bereich des Makaken Antikörpers SEM120-IIIC1 (0,82 nM). Der Humanisierungsgrad der leichten Kette hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Affinität der SEM120-IIIC1-Varianten zu BoNT/A1. Jedoch führte eine weiterführende Humanisierung der schweren Kette (Hu<sub>2</sub>VH/V21>L und Hu<sub>3</sub>VH/V21>L) zu einer reduzierten Bindung der Varianten hu9SEM120-IIIC1 bis hu16SEM120-IIIC1 zu BoNT/A1-L (Abbildung 3.22). Zudem war es nicht Möglich die Affinität für die humanisierten Varianten hu9SEM120-IIIC1 bis hu16SEM120-IIIC1 zu BoNT/A1 zu bestimmen.

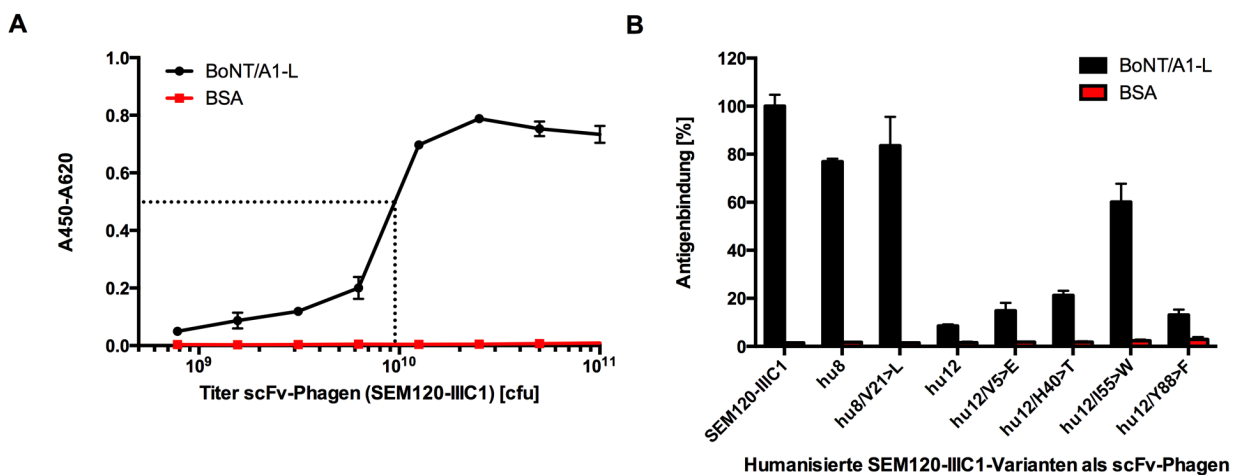
**Tabelle 3.12: SPR-Spektroskopie der humanisierten Varianten von SEM120-IIIC1.** Bestimmung der Dissoziationsrate ( $k_{\text{off}}$ ), Assoziationsrate ( $k_{\text{on}}$ ) sowie der Dissoziationskonstante ( $K_D$ ) der humanisierten Varianten von SEM120-IIIC1 für BoNT/A1 mittels SPR-Spektroskopie. (Durchgeführt vom *Le centre de recherches du service de santé des armées* (CRSSA), Frankreich)

Antikörper-Variante	$k_{\text{off}}$ [ $\text{s}^{-1}$ ]	$k_{\text{on}}$ [ $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ]	$K_D$ [nM]
SEM120-IIIC1	$6,87 \times 10^{-5}$	$8,34 \times 10^4$	0,82
hu1SEM120-IIIC1	$1,14 \times 10^{-4}$	$1,09 \times 10^5$	1,04
hu2SEM120-IIIC1	$1,07 \times 10^{-4}$	$1,06 \times 10^5$	1,02
hu3SEM120-IIIC1	$2,14 \times 10^{-4}$	$1,07 \times 10^5$	1,99
hu4SEM120-IIIC1	$1,48 \times 10^{-4}$	$1,64 \times 10^5$	0,89
hu5SEM120-IIIC1	$1,09 \times 10^{-4}$	$6,35 \times 10^4$	1,71
hu6SEM120-IIIC1	$8,31 \times 10^{-5}$	$5,73 \times 10^4$	1,45
hu7SEM120-IIIC1	$2,27 \times 10^{-4}$	$1,18 \times 10^5$	1,92
hu8SEM120-IIIC1	$1,33 \times 10^{-4}$	$9,41 \times 10^4$	1,41

### 3.9.5 Biochemische Analyse der humanisierten VH-Varianten Hu<sub>1</sub>VH/V21>L und Hu<sub>2</sub>VH/V21>L

Da die humanisierten Varianten von SEM120-IIIC1 mit der schweren Kette Hu<sub>2</sub>VH/V21>L eine geringere Affinität zu BoNT/A1 als der ursprüngliche Antikörper aufwiesen, wurden die mittels IMGT/DomainGapAlign als 'unähnlich' charakterisierten AS-Austausche V5>E, H40>T, I55>W und Y88>F jeweils der Makakensequenz angeglichen und deren Bindung zu BoNT/A1 in der Kombination mit Hu<sub>3</sub>VL untersucht. Ebenfalls wurde die Kombination von Hu<sub>1</sub>VH und Hu<sub>1</sub>VH/V21>L mit Hu<sub>3</sub>VL getestet. Die 3D Strukturanalyse mittels WAM ergab für Hu<sub>1</sub>VH eine strukturelle Änderung der CDR3-Region. Dies sollte anhand der tatsächlichen Bindung zu BoNT/A1 mit Hu<sub>1</sub>VH/V21>L verglichen werden. Die Produktion der unterschiedlichen Varianten als scFv-Fc-Antikörper war nicht erfolgreich, weshalb sämtliche Konstrukte als scFv-Phagen produziert und mittels ELISA analysiert wurden. Die Verpackung erfolgte mittels Hyperphage. Die für den Antigen-ELISA einzusetzende Konzentration an scFv-Phagen wurde zuvor für SEM120-IIIC1 mittels Titrations-ELISA auf BoNT/A1-L bestimmt (Abbildung 3.23, A). Die Antigenbindung von SEM120-IIIC1 auf BoNT/A1-L war bei einem scFv-Phagentiter von  $1 \times 10^{11}$  cfu hochspezifisch und es wurde keine Bindung auf BSA gemessen. Für den folgenden Antigen-ELISA wurde ein scFv-Phagentiter von  $1 \times 10^{10}$  cfu gewählt. Zur Charakterisierung der humanisierten Varianten wurden hu8SEM120-IIIC1/V21>L, hu8SEM120-IIIC1 und SEM120-IIIC1 sowie die vier Varianten hu12SEM120-IIIC1/V5>E, hu12SEM120-IIIC1/H40>T, hu12SEM120-IIIC1/I55>W, hu12SEM120-IIIC1/Y88>F und hu12SEM120-IIIC1 als scFv-Phagen im Antigen-ELISA verglichen und die Antigenbindung der scFv-Phagen auf die von SEM120-IIIC1 (scFv-Phage) normiert

(Abbildung 3.23, B). Im Vergleich zum Makaken Antikörper SEM120-IIIC1 ergaben die Varianten hu8SEM120-IIIC1/V21>L und hu8SEM120-IIIC1 mit etwa 80 % eine geringfügig schlechtere Bindung zu BoNT/A1-L, jedoch wurde für beide Antikörper untereinander kein signifikanter Unterschied gemessen. Ein deutlicher Einbruch der Antigenbindung (10 % der Bindung von SEM120-IIIC1) war mit hu12SEM120-IIIC1 zu verzeichnen. Diese Variante besaß als scFv-Fc-Antikörper eine deutlich schlechter Bindung zu BoNT/A1 und diente als Referenzantikörper für die vier Varianten hu12SEM120-IIIC1/V5>E, hu12SEM120-IIIC1/H40>T, hu12SEM120-IIIC1/I55>W und hu12SEM120-IIIC1/Y88>F. Von den vier Varianten erzielte hu12SEM120-IIIC1/I55>W eine verbesserte Bindung zu BoNT/A1-L gegenüber hu12SEM120-IIIC1 und erreichte in etwa 60 % der Bindung von SEM120-IIIC1.



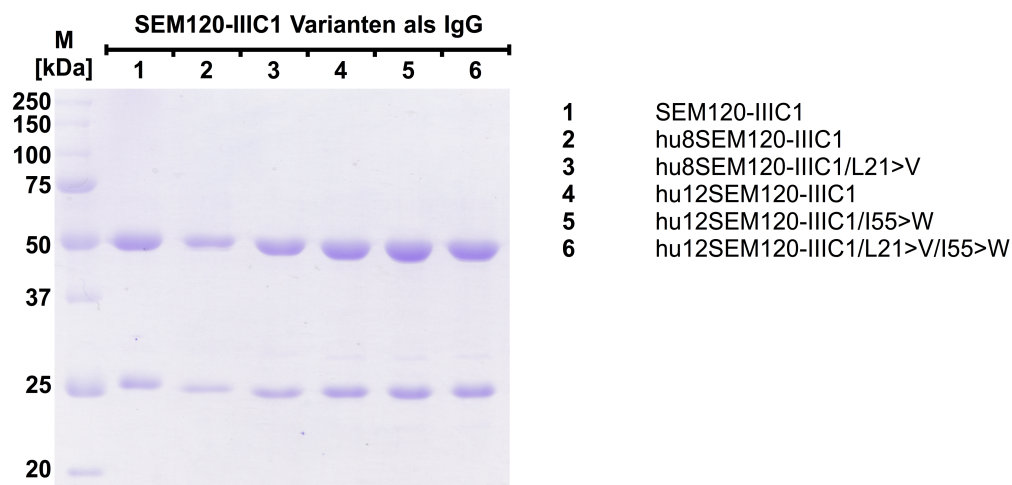
**Abbildung 3.23: Optimierung der humanisierten VH-Varianten Hu<sub>1</sub>VH/V21>L und Hu<sub>2</sub>VH/V21>L.** **A)** Titrations-ELISA von SEM120-IIIC1 als scFv-Phage auf 100 ng immobilisiertem Antigen (BoNT/A1-L sowie BSA). **B)** Antigen-ELISA der unterschiedlichen Varianten von SEM120-IIIC1 als scFv-Phagen auf 100 ng immobilisiertem Antigen (BoNT/A1-L und BSA). Die Detektion erfolgte mittels Maus anti-M13 spezifischen HRP-konjugiertem Sekundärantikörper (1:40.000) und TMB-Färbung.

### 3.9.6 Klonierung, Produktion und Reinigung der humanisierten SEM120-IIIC1 Varianten als humanen IgG

Für weiterführende *ex vivo* Analysen der humanisierten Varianten von SEM120-IIIC1 wurden hu8SEM120-IIIC1, hu8SEM120-IIIC1/L21>V, hu12SEM120-IIIC1, hu12SEM120-IIIC1/I55>W und hu12SEM120-IIIC1/L21>V/I55>W als IgG produziert. Zunächst wurden jeweils VH und VL in die eukaryotischen Expressionsvektoren pCSH1c beziehungsweise pCSL3k (Steinwand *et al.*, 2014) kloniert und für eine transiente Transfektion von HEK293-6E Suspensionszellen im äquimolaren Verhältnis verwendet. Die in das Kulturmedium sekretierten IgG wurden mittels Protein A Affinitätschromatographie gereinigt und die Proteinreinheit über eine SDS-PAGE mit anschließender



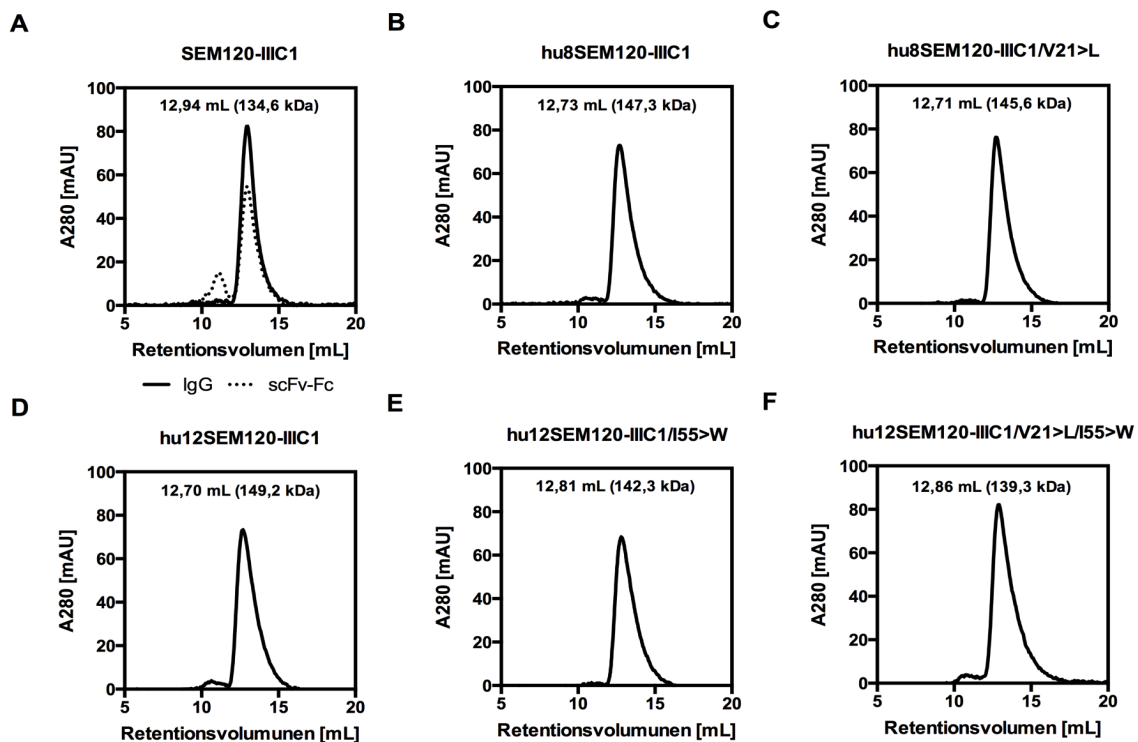
Coomassie-Färbung analysiert (Abbildung 3.24). Sowohl SEM120-IIIC1 als auch die humanisierten Varianten wurden erfolgreich als IgG-Antikörper produziert und gereinigt. Unter reduzierenden Bedingungen spalteten sich die IgG-Antikörper in eine etwa 50 kDa große schwere Kette sowie 25 kDa große leichte Kette.



**Abbildung 3.24: SDS-PAGE der humanisierten Varianten von SEM120-IIIC1 als IgG.** Nach der Protein A Affinitätschromatographie wurde zur Überprüfung der Reinheit der produzierten IgG je 1 µg unter reduzierenden Bedingungen (Laemmli-Puffer mit β-Mercaptoethanol, 95 °C) für eine SDS-PAGE verwendet (12 %-igem PAA-Gel) und anschließend mittels Coomassie-Färbung visualisiert.

### 3.9.7 Bestimmung des Aggregationsverhaltens der humanisierten SEM120-IIIC1 Varianten mittels Größenausschlusschromatographie

Das Aggregationsverhalten der unterschiedlichen Antikörpervarianten wurde mittels einer analytischen Größenausschlusschromatographie (SEC, *size exclusion chromatography*) untersucht (Abbildung 3.25). Hierbei korreliert die Molekularmasse mit dem Retentionsvolumen und wurde mittels einer zuvor durchgeführten Kalibrierung mit unterschiedlichen Proteinen mit bekanntem Molekulargewicht ermittelt. Abhängig von seiner individuellen Sequenz beträgt das Molekulargewicht eines IgGs als Heterodimer etwa 150 kDa. Hingegen beträgt das Molekulargewicht eines scFv-Fc-Antikörpers als Homodimer in etwa 110 kDa. Sämtliche im IgG-Format vorliegenden Varianten lagen etwa zu 99 % als Heterodimer vor und wiesen ein Molekulargewicht zwischen 134,6 kDa und 149,2 kDa auf. Im scFv-Fc-Format wurde für SEM120-IIIC1 mittels SEC-Analyse neben den Homodimeren die Ausbildung von Tetrameren nachgewiesen, dessen prozentualer Anteil bei etwa 15 % lag (Abbildung 3.25, A).

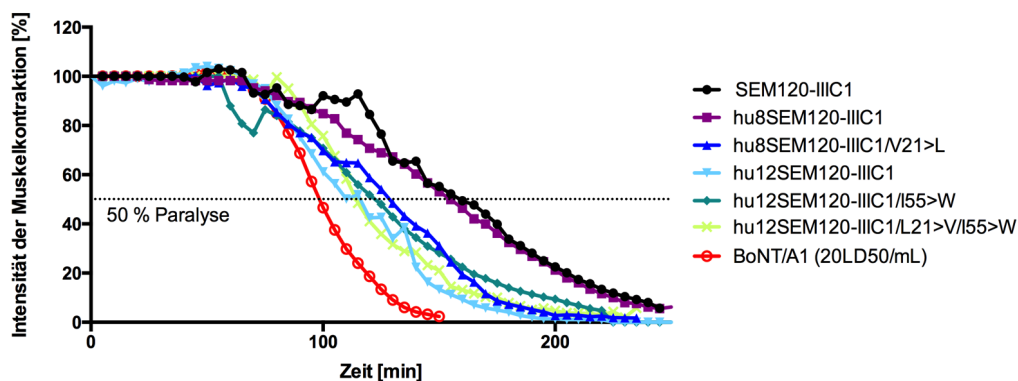


**Abbildung 3.25: Bestimmung des Aggregationsverhaltens der humanisierten SEM120-IIIC1-Varianten mittels Größenausschlusschromatographie.** Analytische Größenausschlusschromatographie zur Bestimmung des Aggregationsverhaltens von **A)** SEM120-IIIC1 als scFv-Fc (···) und IgG (—) **B)** hu8SEM120-IIIC1 (IgG) **C)** hu8SEM120-IIIC1/V21>L (IgG) **D)** hu12SEM120-IIIC1 (IgG) **E)** hu12SEM120-IIIC1/I55>W (IgG) **F)** hu12SEM120-IIIC1/V21>L/I55>W (IgG). Es wurde die Superdex200 *increase* 10/300 GL Säule mit einer Trennleistung von 10-600 kDa bei einer Flussrate von 0,5 mL/min verwendet. Als Laufpuffer wurde sterilfiltriertes (0,2 µm) PBS verwendet und jeweils 150 µg Antikörper aufgetrennt. Dargestellt ist die Absorption bei 280 nm in Korrelation zum Retentionsvolumen [mL].

### 3.9.8 *Ex vivo Nervus phrenicus hemidiaphragma* Assay mit den humanisierten Varianten von SEM120-IIIC1 als IgG

Um den Einfluss der Humanisierung auf die Toxin-Neutralisation zu untersuchen, wurde die 50 % Paralysezeit der unterschiedlich humanisierten Varianten von SEM120-IIIC1 im IgG-Format mittels *ex vivo Nervus phrenicus hemidiaphragma* Assay bestimmt und dem Makaken Antikörper SEM120-IIIC1 (IgG) gegenübergestellt. Hierzu wurde eine Präparation des *Nervus phrenicus hemidiaphragma* mit BoNT/A1 (87 pg/mL; 20LD<sub>50</sub>/mL) sowie mit den jeweiligen IgG-Varianten (30 µg/mL) inkubiert und die 50 % Paralysezeit bestimmt (Abbildung 3.26, Tabelle 3.13). Als Referenz diente die durch BoNT/A1 hervorgerufene Paralyse, dessen 50 % Paralysezeit bei einer Konzentration von 87 pg/mL bei etwa 98 min lag. Der Antikörper hu12SEM120-IIIC1 diente als zusätzliche Negativ-Kontrolle und besaß eine 50 % Paralysezeit von 114 min. Dieser Antikörper wies zuvor im ELISA eine deutlich schlechtere Bindung zu BoNT/A1 auf. Zudem war für hu12SEM120-IIIC1 keine Affinitätsbestimmung mittels SPR-Spektroskopie möglich. Die 50 %

Paralysezeit des Makaken Antikörpers SEM120-IIIC1 lag bei 157 min. Der humanisierte Antikörper hu8SEM120-IIIC1 war bezüglich seiner Toxin-Neutralisation mit einer 50 % Paralysezeit von 154 min nahezu identisch mit dem ursprünglichen Makaken Antikörper. Hingegen führte der AS-Austausch (V21>L) in der schweren Kette von hu8SEM120-IIIC1/V21>L zu einer verschlechterten Toxin-Neutralisation mit einer 50 % Paralysezeit von 128 min. Im Vergleich zu hu12SEM120-IIIC1 besaß hu12SEM120-C1/I55>W eine leichte Verbesserung bezüglich der Toxin-Neutralisation. Die 50 % Paralysezeit von hu12SEM120-C1/I55>W betrug 121 min. Dieser Antikörper unterscheidet sich lediglich in einer Aminosäure von hu12SEM120-IIIC1. Ein zusätzlicher Austausch (V21>L) in der schweren Kette von hu12SEM120-IIIC1/L21>V/I55>W führte wiederum zu einer Verschlechterung der Toxin-Neutralisation mit einer 50 % Paralysezeit von 115 min (Tabelle 3.13).



**Abbildung 3.26:** *Ex vivo Nervus phrenicus hemidiaphragma* Assay mit den humanisierten Varianten von SEM120-IIIC1 als IgG. Neutralisation von BoNT/A1 (87 pg/mL; 20LD<sub>50</sub>/mL) durch die SEM120-IIIC1 Varianten als IgG (30 µg/mL). Als Kontrolle für die Paralyse der *Nervus phrenicus hemidiaphragma* Präparationen wurde BoNT/A1 ohne Antikörper über die Zeit gemessen.

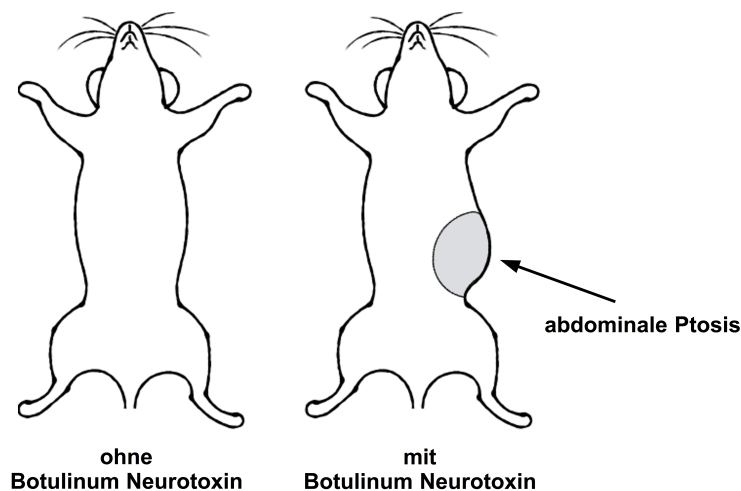
**Tabelle 3.13:** *Ex vivo Nervus phrenicus hemidiaphragma* Assay mit den humanisierten Varianten von SEM120-IIIC1 als IgG. Die 50 % Paralysezeit [min] von BoNT/A1 (87 pg/mL; 20 LD<sub>50</sub>/mL) mit den jeweiligen anti-BoNT/A1-L Antikörpern als IgG (30 µg/mL).

Antikörper	50 % Paralysezeit [min]	Antikörper	50 % Paralysezeit [min]
SEM120-IIIC1	157	hu12SEM120-IIIC1	114
hu8SEM120-IIIC1	154	hu12SEM120-IIIC1/I55>W	121
hu8SEM120-IIIC1/V21>L	128	hu12SEM120-IIIC1/I55>W/V21>L	115

### 3.10 *In vivo* Paralyse Assay mit hu8SEM120-IIIC1

Zur Validierung der gemessenen Neutralisation von BoNT/A1 durch hu8SEM120-IIIC1 im *ex vivo Nervus phrenicus hemidiaphragma* Assay wurde die protektive Wirkung des Antikörpers am

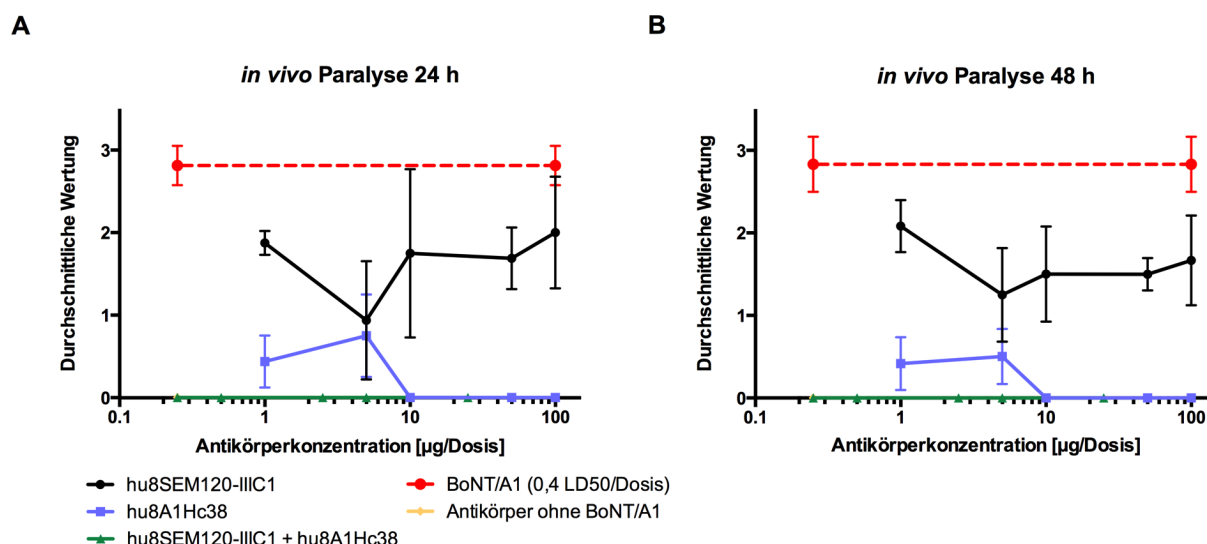
National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC) mittels des *in vivo* Paralyse Assays untersucht. Zusätzlich zu hu8SEM120-IIIC1 wurde der anti-BoNT/A1 spezifische Antikörper hu8A1Hc38 verwendet, um einen möglichen Synergieeffekt zu analysieren. Hierbei handelt es sich um einen humanisierten IgG-Antikörper, welcher im Rahmen dieser Dissertation generiert wurde und die schwere Kette von BoNT/A1 (BoNT/A1-Hc) bindet (AntiBotABE). Die Protektivität der Antikörper wurde 24 h beziehungsweise 48 h nach Injektion der Antikörper-Toxin-Mischung in die linke *regio inguinalis* von BALB/c Mäusen anhand der Intensität der durch BoNT/A1 hervorgerufenen abdominalen Ptosis (Abbildung 3.27) beurteilt. Die Versuchsgruppen umfassten jeweils 4 BALB/c Mäuse, denen 5 unterschiedlichen Konzentration (1 µg, 5 µg, 10 µg, 50 µg und 100 µg) von hu8SEM120-IIIC1 beziehungsweise hu8A1Hc38 mit BoNT/A1 injiziert wurden. Zusätzlich wurde eine Versuchsgruppe mit einer Kombination aus hu8SEM120-IIIC1, hu8A1Hc38 und BoNT/A1 behandelt. Je Antikörper wurden hierfür 0,25 µg, 0,5 µg, 2,5 µg, 5 µg und 25 µg verwendet. Des Weiteren wurde eine Kontrollgruppe mit hu8SEM120-IIIC1 und hu8A1Hc38 sowie eine Weitere mit BoNT/A1 behandelt. Die Ausprägung der durch die Paralyse hervorgerufenen abdominalen Ptosis wurde mittels einer Skala von 0 – 4 beurteilt (Abbildung 3.28, A und B).



**Abbildung 3.27: Schematische Darstellung der abdominalen Ptosis von BALB/c Mäusen.** Auswirkung einer subkutanen Injektion von BoNT/A1 (0,4LD<sub>50</sub>) in die linke *regio inguinalis* von BALB/c Mäusen und damit assoziierten Ausprägung einer abdominalen Ptosis. Links ohne BoNT/A1. Rechts mit BoNT/A1 (abdominale Ptosis in Grau).

Die durchschnittliche Beurteilung der abdominalen Ptosis bei den BALB/c Mäusen, welche nur mit BoNT/A1 behandelt wurden, lag sowohl nach 24 h und 48 h bei 2,8. Bei der Kontrollgruppe, welche eine Kombination aus hu8SEM120-IIIC1 und hu8A1Hc38 ohne BoNT/A1 injiziert wurde, konnte nach 24 h sowie 48 h keine abdominale Ptosis beobachtet werden. Bei den BALB/c Mäusen, welche mit hu8SEM120-IIIC1 behandelt wurden, kam bei 1 µg sowie 100 µg eine moderat ausgeprägte abdominale Ptosis zum Vorschein. Im Vergleich zu der Kontrollgruppe (BoNT/A1)

wurde die Toxizität von BoNT/A1 leicht reduziert. Für den anti-BoNT/A1-Hc spezifischen Antikörper hu8A1Hc38 wurde bei einer Antikörperkonzentration von 10-100 µg/Dosis keine abdominale Ptosis beobachtet, lediglich bei einer Konzentration von 1 µg/Dosis und 5 µg/Dosis wurde eine bedingte abdominale Ptosis festgestellt. Hingegen waren beide Antikörper in Kombination bereits ab einer Konzentration von 0,25 µg/Dosis vollständig protektiv und es zeichnete sich keine abdominale Ptosis ab.



**Abbildung 3.28: *In vivo* Paralyse Assay.** *In vivo* Paralyse Assay mit den anti-BoNT/A1 spezifischen Antikörpern hu8SEM120-IIIC1 und hu8A1Hc38 mittels subkutaner Injektion von 100 µL Antikörper-Toxin-Lösung in die linke *regio inguinalis* von BALB/c Mäusen. Die Ausprägung der abdominalen Ptosis wurde von 3 Personen anhand einer Skala von 0 – 4 bewertet, wobei 0 – Negativ, 1 – Bedingt, 2 – Moderat, 3 – Erheblich und 4 – Maximal entsprach. Jeder Versuchsgruppe bestand aus 4 BALB/c Mäusen und wurde entweder mit BoNT/A1 (0,4LD<sub>50</sub>), hu8SEM120-IIIC1 (mit BoNT/A1), hu8A1Hc38 (mit BoNT/A1) sowie hu8SEM120-IIIC1 + hu8A1Hc38 (mit BoNT/A1) und hu8SEM120-IIIC1 + hu8A1Hc38 (ohne BoNT/A1) behandelt. Die Beurteilung der abdominalen Ptosis erfolgte nach **A**) 24 h und **B**) 48 h. (Durchgeführt vom *National Institute for Biological Standards and Control* (NIBSC), UK)

### 3.11 *In vivo* Maus Letalitäts (MLD) Assay mit hu8SEM120-IIIC1 und hu8A1Hc38

Zur Bestimmung der Toxin-Neutralisation und zur Validierung der Ergebnisse aus dem *in vivo* Paralyse Assay wurde die protektive Wirkung von hu8SEM120-IIIC1 und hu8A1Hc38 am *Institut Pasteur* (Frankreich) mittels des *in vivo* Maus Letalitäts (MLD) Assays untersucht. Hierfür wurden jeweils hu8SEM120-IIIC1 und hu8A1Hc38 einzeln und in Kombination mit BoNT/A1 (10MLD<sub>50</sub>/mL) gemischt und je 0,5 mL der Antikörper-Toxin-Mischung (entspricht 5MLD<sub>50</sub> (BoNT/A1)) in swiss Mäuse intraperitoneal (i.p.) injiziert. Die effektive Antikörperkonzentration pro Maus betrug dabei 25 µg, 2,5 µg sowie 250 ng (Tabelle 3.14). Bei einer Antikörperkonzentration (hu8SEM120-IIIC1) von 25 µg/Maus überlebte 1 Maus mit stark ausgeprägten Intoxikationssymptomen. Bei 2,5 µg/Maus überlebten 3 Mäuse, von denen 1 stark symptomatisch war, währende hingegen bei

einer Konzentration von 250 ng/Maus keine Maus überlebte. Bei einer Applikation von 25 µg/Maus (hu8A1Hc38) überlebten alle Versuchstiere, jedoch mit stark ausgeprägten Intoxikations-symptomen. Bei einer Konzentration von 2,5 µg/Maus überlebten 2 Mäuse beziehungsweise bei 250 ng/Maus überlebte 1 Versuchstier. In Kombination von hu8SEM120-IIIC1 und hu8A1Hc38 trat ein Synergieeffekt ein, bei dem bei einer Konzentration von 2,5 µg/Maus alle 8 Versuchstiere überlebten. Selbst bei einer Konzentration von 250 ng/Maus überlebte die Hälfte der Versuchstiere, von denen jedoch 2 Versuchstiere Intoxikationssymptome aufwiesen.

**Tabelle 3.14: *In vivo* Maus Letalitäts (MLD) Assay mit hu8SEM120-IIIC1 und hu8A1Hc38.** MLD Assay (5MLD<sub>50</sub> (BoNT/A1)) mit den Antikörpern hu8SEM120-IIIC1 und hu8A1Hc38 mittels Injektion (i.p.) der Antikörper-Toxin-Mischung in swiss Mäusen. Intoxikationssymptome wurden über einen Zeitraum von 4 Tagen beobachtet und die Sterblichkeit in 'Anzahl überlebende Mäuse/Gesamtanzahl' angegeben.

Antikörper- konzentration	hu8SEM120-IIIC1	hu8A1Hc38	hu8SEM120-IIIC1 + hu8A1Hc38
25 µg/Maus	1/4 (1 stark symptomatisch)	4/4 (4 stark symptomatisch)	8/8
2,5 µg/Maus	3/4 (1 stark symptomatisch)	2/4	8/8
250 ng/Maus	0/4	1/4	4/8 (2 symptomatisch)

## 4 Diskussion

Botulinum Neurotoxin (BoNT) gehört zu den giftigsten in der Natur vorkommenden Substanzen und wird überwiegend mit einer Lebensmittelvergiftung assoziiert. Die durch BoNT hervorrufoende Erkrankung wird auch als Botulismus bezeichnet und ist nicht nur mit einer Lebensmittelvergiftung verbunden, auch die Inhalation von BoNT oder die Kolonialisierung von Wundgewebe sowie des Gastrointestinaltraktes durch *Clostridium botulinum* sind mögliche Quellen einer Intoxikation (Dembek *et al.*, 2007). Von den bisher 8 bekannten Serotypen (A-H) zählt Serotyp A, mit einem LD<sub>50</sub> Wert (Letale Dosis) von 1 ng/kg intravenöser und subkutaner Applikation beziehungsweise 3 ng/kg pulmonaler Applikation zu dem potentesten Toxin (Gill, 1982). BoNT/A1 ist hierbei der am häufigsten vorkommende Subtyp von BoNT/A (Hill *et al.*, 2007). Aufgrund seiner hohen Toxizität wurde BoNT vom *Centers of Disease Control and Prevention* (CDC) als potenzielle Biowaffe der Kategorie A klassifiziert und zählt somit zu den 6 Agenzien mit der höchsten Risikobewertung (Froude *et al.*, 2011). So umfasste das irakische Giftwaffenprogramm unter Saddam Husain, nach Aussagen der UN, Munition mit ca. 10.000 L einsatzfähigem BoNT (Arnon *et al.*, 2001). Auch deuten Berichte darauf hin, dass die japanische AUM-Sekte sowie eine Splittergruppe der Baader-Meinhof-Gruppe mit Botulinum Neurotoxin experimentiert haben (Broad, 1998; Tucker, 2000).

Abhängig von der jeweilig aufgenommen Toxinmenge beträgt die Inkubationszeit wenige Stunden bis zu 10 Tagen oder länger (Friesecke *et al.*, 2007). Im fortgeschrittenem Stadium der Intoxikation tritt der Tod durch die Paralyse der Atemmuskulatur ein, weshalb der alleinige Verdacht auf Botulismus bereits eine sofortige Hospitalisierung und medizinische Versorgung erfordert. Aufgrund strenger Hygienerichtlinien in der Lebensmittelindustrie beträgt die Zahl der Krankheitsfälle in Deutschland lediglich 20-40 Fälle pro Jahr (Eisenbrand & Schreier, 2006). Das Hauptaugenmerk liegt somit im Zivilschutz und der Gefahrenabwehr potenzieller bioterroristischer Anschläge. Der bisherige Therapieansatz setzt auf die passive Immunisierung mit Pferdeantiserum (Hibbs *et al.*, 1996) beziehungsweise im Fall von Säuglingsbotulismus auf Humanseren, wie BabyBig® (Arnon *et al.*, 2001, 2008). Jedoch ist die für die therapeutische Applikation vorrätige Menge an Humanseren limitiert, welches sich auch in den hohen Kosten von 45.300 \$ pro Infusion für eine Behandlung mit BabyBig® widerspiegelt (May *et al.*, 2010). Die Verwendung von nicht-humanen Präparaten, wie Pferdeantiseren, birgt ein hohes Risiko der Ausprägung einer Hypersensitivität beziehungsweise Serumkrankheit (Black & Gunn, 1980). Dies verdeutlicht die Notwendigkeit eines Präparates, welches die hohe Verfügbarkeit von Pferdeseren und die geringe Immunogenität von Humanseren in sich vereint.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Vorteile einer Immunisierung von nicht-humanen Primaten (*Macaca fascicularis*) und der anschließenden Generierung einer Immunbibliothek gegen BoNT/A1

sowie die Isolierung von Antikörpern mittels Phagen Display miteinander verbunden. Die Immunisierung von *M. fascicularis* erlaubte die spätere Isolierung von affinitätsgereiften Antikörper mit human-ähnlichem Charakter (Thullier *et al.*, 2010). Auch wurde so eine anschließende Humanisierung der Antikörper erleichtert (Pelat & Thullier, 2009). Eine weitere Möglichkeit zur Generierung von BoNT spezifischen Antikörper bot die Verwendung der humanen naiven Antikörpergenbibliotheken HAL9/10 (Kügler *et al.*, *in preparation*). Sämtliche Antikörper wurden im Bezug auf die Inhibition der Endopeptidase Aktivität von BoNT/A1 beziehungsweise Toxin-Neutralisation untersucht und der für einen therapeutischen Einsatz vielversprechendste Antikörper für eine anschließende Humanisierung verwendet.

### 4.1 Generierung spezifischer Antikörper gegen die leichte Kette von BoNT/A1

Der Erfolg von therapeutischen Antikörper ist stark davon Abhängig bestimmte Epitope mit hoher Affinität zu binden sowie dessen mögliche Immunogenität im Menschen. Durch eine möglichst hohe Übereinstimmung der Antikörper mit entsprechenden humanen Immunglobulinen, besonders im Bereich der *framework* Regionen, ist es möglich eine Immunantwort im Patienten zu minimieren (Schellekens, 2002; Bellet & Dangles-Marie, 2005). Häufig werden für die Generierung neuer Antikörper naive oder synthetische Antikörpergenbibliotheken verwendet (Hust *et al.*, 2011; Griffiths *et al.*, 1994; Sheets *et al.*, 1998).

Naiven Antikörpergenbibliotheken beziehen sich auf das IgM Repertoire, während in synthetische Bibliotheken die Diversität durch randomisierte CDRs komplettiert wurde. Eine Alternative zu den naiven und synthetischen Antikörpergenbibliotheken bieten beispielsweise Immunbibliotheken von nicht-humanen Primaten (Pelat *et al.*, 2007, 2009; Schütte *et al.*, 2009). Die Affinität von Antikörpern aus Immunbibliotheken von nicht-humanen Primaten ist zwischen 10-1000 fach höher, als die von Antikörpern aus bisherigen naiven oder synthetischen Antikörpergenbibliotheken (Hust *et al.*, 2014; Kirsch *et al.*, 2008; Pelat *et al.*, 2009) und ist zudem mit denen aus humanen Immunbibliotheken vergleichbar (Wild *et al.*, 2003).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde für die Generierung hoch-affiner Antikörper gegen Botulinum Neurotoxin auf Immunbibliotheken von nicht-humanen Primaten zurückgegriffen. Bisherige Untersuchungen von naiven Antikörpergenbibliotheken in Bezug auf BoNT/A ergaben, dass lediglich ein kleiner Teil des Repertoires gegen BoNT/A reaktiv und somit die Anzahl möglicher Epitope limitiert war (Amersdorfer *et al.*, 2002). Für die Immunisierung eines Makaken wurde die nicht-toxische, rekombinant erzeugte leichte Kette von BoNT/A1 verwendet um eine Hyperimmunantwort zu induzieren und das IgG Repertoire für die Generierung einer Antikörpergenbibliothek in pHAL32 verwendet. Eine zuvor generierte Antikörpergenbibliothek in pHAL14 mit dem selben IgG



Repertoire resultierte in einer scFv-Insertrate von lediglich 37 % (Chahboun *et al.*, 2011). Dies war darauf zurückzuführen, dass in der Immunantwort gegen die leichte Kette von BoNT/A1 sowohl VH1 und VH7 Gene mit einer *NcoI* Restriktionsstelle, welche für die Klonierung der VH in pHAL14 verwendet wurde, beteiligt waren. Dies wurde zuvor für keine andere Immunbibliothek beobachtet, bei der auf das Repertoire von *M. fascicularis* zurückgegriffen wurde (Pelat *et al.*, 2007, 2009; Rülker *et al.*, 2012; Schütte *et al.*, 2009). Um die bestehende Immunbibliothek zu verbessern, wurde ein neuer Vektor (pHAL32) entwickelt, welcher auf pHAL14 basierte und zusätzlich zur bisherigen *NcoI* Restriktionsstelle eine weitere *SfiI* Restriktionsstelle für die Klonierung des VH Repertoires aufwies. Mit dem neuen Vektor gelang es die scFv-Insertrate von 37 % auf 80 % mit einer Diversität von  $3,2 \times 10^8$  individuellen scFv-Klonen zu verbessern.

Die Antikörpergenbibliothek wurde anschließend für die Selektion von spezifischen Antikörperphagen verwendet. Die Selektion der Antikörperphagen erfolgte sowohl auf dem Holotoxin sowie auf der leichten Kette von BoNT/A1. Insgesamt wurden drei Selektionsrunden durchgeführt und mit jeder Selektionsrunde die Anzahl der Waschschrte erhöht. Nach der ersten Selektionsrunde auf dem Holotoxin von BoNT/A1 wurden mit der M13K07 verpackten Bibliothek  $1,2 \times 10^5$  scFv-Phagen isoliert, während mit der Hyperphage verpackten Bibliothek lediglich  $2 \times 10^3$  scFv-Phagen isoliert wurden. Dies war zumal überraschend, da die Verwendung von Hyperphage ein polyvalentes Display ermöglichte. Durch die im polyvalenten Display höhere Avidität wird davon ausgegangen, dass auch scFv-Antikörper mit geringer Affinität während der ersten Selektionsrunde erhalten bleiben (Broders *et al.*, 2003). Die anfängliche Limitierung spiegelte sich auch nach der dritten Selektionsrunde wider. So wurden nach der dritten Selektionsrunde  $1,3 \times 10^5$  (M13K07) beziehungsweise  $6,2 \times 10^3$  (Hyperphage) scFv-Phagen isoliert. Mittels Antigen-ELISA (Holotoxin BoNT/A1) wurden 75 scFv-Klone der M13K07-Bibliothek sowie 25 scFv-Klone der Hyperphage-Bibliothek analysiert. Von den insgesamt 100 scFv-Klonen haben 26 scFv BoNT/A1 im ELISA gebunden. Nach anschließender Sequenzierung wurden 17 individuelle scFv-Sequenzen identifiziert, von denen 15 aus der M13K07-Bibliothek und 2 aus der Hyperphage-Bibliothek stammten. Während der Selektion von scFv-Phagen mit der Hyperphage verpackten Antikörpergenbibliothek gegen BoNT/A1-L wurde nach der ersten Selektionsrunde mit  $8,4 \times 10^6$  isolierten scFv-Phagen keine Limitierung, wie bei der Selektion gegen dem Holotoxin, festgestellt. Nach der dritten Selektionsrunde wurden 92 scFv-Klone mittels Antigen-ELISA (BoNT/A1-L) analysiert, von denen 66 scFv die leichte Kette von BoNT/A1 gebunden haben. Nach anschließender Sequenzierung wurden jedoch lediglich 5 unterschiedliche scFv-Sequenzen identifiziert. Dies ließ auf eine limitierte Anzahl von Epitopen schließen, welche während der Antikörperselektion erkannt wurden.

Ein Kriterium für den therapeutischen Einsatz von rekombinanten Antikörpern ist neben der hochspezifischen Antigenbindung deren potenzielle Immunogenität. Generell gilt, je größer der humane Charakter von Antikörpern ist, desto geringer ist deren Immunogenität (Abhinandan & Martin, 2007). Ein Ansatz um den humanen Charakter rekombinanter Antikörper zu analysieren ist der sogenannte *Germinality Index* (GI) (Pelat *et al.*, 2008). Dabei werden die Aminosäuresequenzen der *framework* Regionen der nicht-humanen Antikörper mit denen der entsprechenden humanen Keimbahnlinien mit der höchsten Übereinstimmung verglichen. Es wird angenommen, dass eine möglichst hohe Identität mit den humanen Keimbahnlinien, als Bestandteil des IgM Repertoires des Immunsystems, zu einer optimalen Immuntoleranz führt (Abhinandan & Martin, 2007). Der berechnete GI von 500 scFv, welche aus der humanen naiven Antikörpergenbibliothek HAL7/8 (Hust *et al.*, 2011) stammten, betrug im Durchschnitt 96,6 % (VH) und 94,8 % (VL). Der *Germinality Index* der 22 anti-BoNT/A1 spezifischen scFv betrug für VH zwischen 79,1 % und 91,2 % sowie für VL zwischen 77,5 % und 92,1 %. Zudem wurde der GI von 100 scFv aus unterschiedlichen Makaken Immunbibliotheken berechnet. Hierbei lag der durchschnittliche GI für VH bei 86,7 % und für VL bei 87,1 %. Sequenzanalysen von sämtlichen verfügbaren variablen Regionen von Makaken Antikörpern (*M. fascicularis*) belegten bereits eine hohe Übereinstimmung mit den humanen Keimbahnlinien (Thullier *et al.*, 2010). Zum Vergleich liegt die Übereinstimmung von 3 durch die FDA zugelassenen murinen Antikörper im Bereich der variablen schweren Kette bei 69-75 % (Clark, 2000). Eine späterer Humanisierung der Makaken Antikörper wird somit im Vergleich zu Mausantikörpern erleichtert.

Für weiterführende Analysen wurden die 22 selektierten scFv sowie 2H8 und 43RCA (anti-Rizin) in dem für die Produktion von scFv-Fc-Antikörper in HEK293-6E Zellen geeigneten Vektor pCSE2.5-mIgG2c-Fc-XP (Jäger *et al.*, 2013) kloniert. Im Vergleich zum scFv-Format bietet ein scFv-Fc ein IgG-ähnliches Antikörperformat mit bivalenten Bindungseigenschaften sowie längerer Serumhalbwertszeit und der Effektorfunktion des Fc-Teils (Bujak *et al.*, 2014). Zudem ermöglicht die Fusion mit einem Fc-Teil eine höhere Expressionsrate (Carter *et al.*, 2010) und die effektive Reinigung mittels Protein A Affinitätschromatographie (Yang & Rader, 2012). Der Expressionsvektor pCSE2.5-mIgG2c-Fc-XP codiert den murinen IgG2c-Fc-Teil. Der Fc-Teil befindet sich hierbei in einer Vektorkassette und ist beliebig austauschbar (Jäger *et al.*, 2013). So lässt sich der Fc-Teil je nach Verwendungszweck durch unterschiedliche Isotypen oder einem humanen Fc-Teil ersetzen. Von den 22 selektierten scFv wurden 18 erfolgreich als scFv-Fc produziert und deren Bindung an die leichte Kette von BoNT/A1 mittels Antigen-ELISA nachgewiesen. Sämtliche anti-BoNT/A1 spezifischen Antikörper haben als scFv-Fc mit unterschiedlicher Intensität an die rekombinante leichte Kette von BoNT/A1 gebunden. Jedoch zeichnete sich die Tendenz ab, dass Antikörper,

welche zuvor auf der rekombinanten leichten Kette von BoNT/A1 selektiert wurden, im Vergleich zu den auf dem Holotoxin selektierten Antikörpern eine stärkere Bindung aufwiesen. Bei der Immobilisierung von Proteinen an Kunststoffoberflächen kann es zu einer partiellen Denaturierung und damit verbundenen Konformationsänderung kommen (Mansur *et al.*, 2005; Schütte *et al.*, 2009). Dies führt dazu, dass Antikörper, welche ein konformationelles Epitope binden, unter Umständen nicht mehr beziehungsweise schlechter das immobilisierte Antigen binden. Eine Möglichkeit dies zu Umgehen ist die Immobilisierung von biotinyliertem Antigen mittels Streptavidin oder der Kopplung an magnetische Partikel (Gross *et al.*, 2006; Matsumoto *et al.*, 2008; Omidfar *et al.*, 2004).

#### **4.2 Antikörper-vermittelte Inhibition der Endopeptidase Aktivität sowie Neutralisation der Toxizität von BoNT/A1**

Die Toxizität von BoNT/A1 ist massgeblich durch die Endopeptidase Aktivität der leichten Kette gekennzeichnet (Fu *et al.*, 2006). Mehrere Antikörper, die die schwere Kette von BoNT binden und die Toxin-Internalisierung inhibieren, wurden bereits beschrieben (Amersdorfer *et al.*, 1997; Cheng *et al.*, 2009; Kalb *et al.*, 2009; Nowakowski *et al.*, 2002). Hingegen sind bisher nur wenige Antikörper bekannt, die spezifisch die leichte Kette von BoNT/A1 binden und die Endopeptidase Aktivität inhibieren. Dazu zählt der humane Antikörper 4LCA, der Lama Antikörper Aa1 und der Makaken Antikörper 2H8 (Adekar *et al.*, 2008; Dong *et al.*, 2010; Chahboun *et al.*, 2011). Aufzeichnungen mit fluoreszenzmarkiertem BoNT sowie 4LCA belegen, dass 4LCA nicht die Toxin-Internalisierung blockiert, sondern zusammen mit BoNT internalisiert wird und die Endopeptidase Aktivität inhibiert. Eine direkte Inhibition der Endopeptidase Aktivität von BoNT/A1 und der enzymatischen Spaltung von SNAP-25 wurde für die Antikörper Aa1 und 2H8 nachgewiesen. Antikörper, welche lediglich die schwere Kette von BoNT/A binden und somit die Toxin-Internalisierung blockieren, verlieren als Therapeutikum an Effektivität sobald das Toxin internalisiert wurde. Die Inhibition der Endopeptidase Aktivität durch Antikörper, welche direkt mit der leichten Kette interagieren, bietet den Vorteil einer Toxin-Neutralisation nach dessen Internalisierung. Dieser Mechanismus ist besonderes interessant für die Anwendung von sogenannten *Transbodies* oder *Intrabodies* (Heng & Cao, 2005) und würde ein Therapieansatz nach bereits bestehender Intoxikation ermöglichen.

Eine etablierte Methode zur Bestimmung der Antikörper-vermittelten Inhibition der Endopeptidase Aktivität von BoNT/A1 ist das *in vitro* Endopeptidase Immunassay (Jones *et al.*, 2008). Zusätzlich zu 2H8 wurden 8 Antikörper identifiziert, welche die Endopeptidase Aktivität von BoNT/A1

inhibieren und keine Interferenz oder Hintergrundbindung im Immunassay aufwiesen. Um die Inhibition unterschiedlicher Antikörper miteinander vergleichen zu können, wurde die Antikörperkonzentration bei der 50 % der Endopeptidase Inhibition auftrat sowie das molare Verhältnis von Antikörper zu Toxin ermittelt. Für die besten 3 scFv-Fc (SEM120-IIIC4, SEM120-IID5 und SEM120-IIIC1) wurde eine 50 %-ige Inhibition der Endopeptidase Aktivität bei einer Konzentration von  $1,5 \times 10^{-5} \mu\text{g/mL}$ ,  $4,0 \times 10^{-5} \mu\text{g/mL}$  und  $1,5 \times 10^{-4} \mu\text{g/mL}$  gemessen. Dies entspricht einem molaren Verhältnis von Antikörper zu Toxin von 0,5:1 (SEM120-IIIC4), 1:1 (SEM120-IID5) und 5:1 (SEM120-IIIC1). Ein molares Verhältnis von 0,5:1 entspricht im Fall von SEM120-IIIC4 einem 1 zu 1 Bindungsverhältnis von Antigenbindungsstelle und Toxin. Für 2H8 wurde ein molares Verhältnis von scFv zu Toxin von 64.000:1 beschrieben (Chahboun *et al.*, 2011), als scFv-Fc-Antikörper betrug das molare Verhältnis 6.500:1. Die Konvertierung vom scFv- ins scFv-Fc-Format, im Fall von 2H8, führte zu einem Aviditätseffekt, welcher in einer gesteigerten Endopeptidase Inhibition resultierte. Für den humanen IgG 4LCA wurde mittels *in vitro* Endopeptidase Immunassay eine 63 %-ige Inhibition der Endopeptidase Aktivität bei einem molaren Verhältnis von 10.000:1 bestimmt (Adekar *et al.*, 2008). Hingegen betrug das molare Verhältnis (Toxin:Antikörper) von Aa1 als *single domain antibody* (sdAb) 200:1. Jedoch sollte berücksichtigt werden, dass sich dieses Verhältnis lediglich auf die Interaktion mit der leichten Kette bezieht. Untersuchungen mit dem Holotoxin von BoNT/A1 wurden nicht durchgeführt (Dong *et al.*, 2010). Mittels dem *in vitro* Endopeptidase Immunassay konnte die Anzahl der für folgenden Neutralisationsstudien verwendeten Antikörper von 22 auf 8 reduziert werden.

Zur Validierung der *in vitro* Ergebnisse und zur Bestimmung der Antikörper-vermittelten Toxin-neutralisation wurde das *Nervus phrenicus hemidiaphragma* Assay verwendet. Hierbei handelt es sich um ein *ex vivo* Assay, welches die durch BoNT verursachte *in vivo* auftretende respiratorische Paralyse imitiert (Rasetti-Escargueil *et al.*, 2009). Zudem korrelieren die Ergebnisse des *ex vivo* Assays mit bestehenden *in vivo* Mausmodellen, um die neutralisierenden Eigenschaften von Antikörper sowie polyklonalen Antiseren gegen BoNT/A/B und E zu analysieren (Rasetti-Escargueil *et al.*, 2011). Um die unterschiedlichen Antikörper vergleichen zu können, wurde die 50 % Paralysezeit bei einer definierten Antikörperkonzentration von  $30 \mu\text{g/mL}$  bestimmt. Von den 8 analysierten Antikörpern, welche die Endopeptidase Aktivität von BoNT/A1 *in vitro* inhibierten, haben im *ex vivo* Assay 7 Antikörper die Toxizität von BoNT/A1 neutralisiert. Die beste Neutralisation mit einer 50 % Paralysezeit von 202 min besaß SEM120-IID5, gefolgt von SEM120-IIIC1 mit 200 min. Im Vergleich betrug die 50 % Paralysezeit von BoNT/A1 ( $20\text{LD}_{50}$ ) ohne zusätzliche Antikörperpräparation 98 min. Vorherige Studien bezüglich des *Nervus phrenicus hemidiaphragma* Assays ergaben innerhalb der Messungen der 50 % Paralysezeit eine

Standardabweichung von 1,6 min bis 7,7 min (Rasetti-Escargueil *et al.*, 2009). Somit kann davon ausgegangen werden, dass die durch SEM120-IID5 und SEM120-IIIC1 vermittelte Toxin-Neutralisation nahezu identisch ist. Der Antikörper SEM95-C6 inhibierte im Endopeptidase Immunassay die durch BoNT/A1 vermittelte enzymatische Spaltung von SNAP-25. Jedoch war SEM95-C6 im *ex vivo* Assay nicht neutralisierend, sondern führte mit einer 50 % Paralysezeit von 90 min zu einer leicht erhöhten Toxizität von BoNT/A1. Gleiches galt für den anti-Rizin Antikörper 43RCA mit einer 50 % Paralysezeit von 76 min. Eine durch Antikörper vermittelte erhöhte Toxizität von BoNT/A1 wurde bereits bei einem molaren Verhältnis von 1:1 (Antikörper:Toxin) beschrieben. Dies führt zur Schlussfolgerung, dass bestimmte Epitope durch die Antikörperbindung zu einer Konformationsänderung von BoNT führen und dadurch die Toxizität erhöhen (Sheridan *et al.*, 2001). Zudem wurde anhand von SEM95-C6 verdeutlicht, dass eine *in vitro* Inhibition der Endopeptidase Aktivität von BoNT/A1 nicht zwangsweise gleichbedeutend mit einer Toxin-Neutralisation ist.

#### **4.3 Charakterisierung der Endopeptidase Aktivität inhibierenden sowie neutralisierenden Antikörper**

Zur nähere Charakterisierung der Antigenbindung der BoNT/A1 spezifischen Antikörper, welche die Endopeptidase Aktivität inhibieren beziehungsweise die Toxizität neutralisieren, wurde eine Epitopklassifizierung vorgenommen. Von den 8 analysierten Antikörpern haben SEM95-C6 und SEM95-G8 ein kontinuierliches Epitop gebunden. Gleiches galt, wenn auch in schwächerer Form, für SEM120-IE4. Die Antikörper SEM119-IE2, SEM120-IID5, SEM120-IIIC1, SEM120-IIIC4 und SEM120-IVC5 haben weder die reduzierte noch nicht-reduzierte Form von BoNT/A1-L gebunden. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass es sich hierbei um ein diskontinuierliches Epitop handelt. Da zudem keine Bindung gegen die nicht-reduzierte Form von BoNT/A1-L auftrat, deutet dies auf eine partielle Denaturierung des Antigens hin. Durch das in der SDS-PAGE verwendete SDS, wie auch durch den Transfer auf die PVDF-Membran, wird die naive Struktur beeinflusst. Interessanterweise haben die Antikörper, welche gegen die rekombinante leichte Kette von BoNT/A1 selektiert wurden, kontinuierliche Epitope gebunden. Dies unterstützt die Annahme, dass während der Immobilisierung des Antigens eine partielle Denaturierung erfolgte. Die Art der Immobilisierung sowie das verwendete Antigen haben einen großen Einfluss auf den Erfolg der Antikörperselektion und die Art der Epitope, welche gebunden werden. Der Antikörper SEM120-IE4 bindet anscheinend einen Bereich von BoNT/A1, welcher zum Teil aus einem kontinuierlichen Epitop besteht, aber in seiner Gesamtheit ein diskontinuierliches Epitop darstellt. Mit den beiden Antikörpern SEM95-C6 und SEM95-G8, welche ein kontinuierliches Epitop gebunden haben,

wurde eine nähere Epitop-Kartierung durchgeführt. Da es sich bei SEM95-G8 um ein neutralisierendes Epitop handelte, durfte im Rahmen dieser Arbeit lediglich das Epitop von SEM95-C6 veröffentlicht werden. Die Veröffentlichung neutralisierender Epitopen birgt die Gefahr, dass diese minimal verändert werden ohne die Toxizität von BoNT/A1 zu beeinträchtigen. Dies würde dazu führen, dass eventuell neutralisierende Antikörper nicht mehr Protektiv sind. Das für SEM95-C6 identifizierte Epitop ist Teil von 4 separaten Regionen in der leichten Kette von BoNT/A1, welche eine Immunreaktion in Kaninchen hervorgerufen haben (Zdanovsky *et al.*, 2012). Immunogene Sequenzen sind besonders für die Entwicklung neuer auf Peptid-Basis bestehenden Vakzinen interessant (Reche *et al.*, 2014). Bisherige Vakzine für BoNT beruhen auf Formalin-inaktivierte Toxoide (Smith, 2009). Der Vertrieb eines der ersten pentavalenten (ABCDE) Botulinum Toxoide wurde jedoch nach 30 Jahren durch die CDC eingestellt, da die Effektivität des Präparates durch längere Lagerung beeinträchtigt wurde (Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2011).

Des Weiteren wurde mittels Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie die Affinität ( $K_D$ ) für 5 der 8 scFv-Fc-Antikörper für BoNT/A1 bestimmt. Diese lag im Bereich von 0,82 nM (SEM120-IIIC1) bis 4,47 nM (SEM98-G8) und waren somit vergleichbar mit bereits publizierten Antikörpern, welche aus Makaken Immunbibliotheken generiert wurden (Pelat *et al.*, 2007; Schütte *et al.*, 2009). Gegenüber naiven Antikörpergenbibliotheken bieten Immunbibliotheken den Vorteil der Selektion hoch-affiner Antikörper, da diese bereits einer *in vivo* Affinitätsreifung unterzogen wurden. So wurde für den aus einer Immunbibliothek stammenden anti-Rizin Antikörper 43RCA eine  $K_D$  von 41 pM bestimmt (Pelat *et al.*, 2009). Die Affinitäten der BoNT/A spezifischen Lama VHH Antikörper reichten von 0,03-230 nM (Dong *et al.*, 2010) sowie für die aus der murinen Immunbibliothek generierten scFv von 1.1 nM bis 73 nM (Amersdorfer *et al.*, 1997). Die für den humanen anti-BoNT/A Antikörper hu510-37IgG1 bestimmte  $K_D$  betrug 100 nM (Hu *et al.*, 2010). Besonders bei der Therapie von Intoxikationen ist eine schnelle Assoziation des Antikörpers mit dem Toxin sowie eine niedrige Dissoziation wichtig, um das Toxin schnellst möglichst aus dem Blutkreislauf zu entfernen beziehungsweise dessen Toxizität zu neutralisieren.

#### 4.4 Selektion kreuzreaktiver Antikörper

Für therapeutische oder diagnostische Applikationen sind Antikörper von besonderem Interesse, welche die 3 human relevanten Serotypen A, B und E von BoNT binden und gegebenenfalls deren Toxizität neutralisieren. Bisherige Therapeutika zur Behandlung von Botulismus basieren meist auf einem polyklonalen Antikörperpräparat (Hill *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2012). Aufgrund der hohen

Diversität von BoNT wurden bisher kaum Antikörper beschrieben, welche mehrere Serotypen binden. Die Diversität der bekannten Serotypen beträgt auf Aminosäure-Ebene bis zu 70 % und auch innerhalb der Serotypen unterscheiden sich die Subtypen zwischen 2,6 % bis 31,6 % (Smith *et al.*, 2005). Mittels Display Technologie und *in vitro* Affinitätsreifung wurde ein scFv-Antikörper mit einer Affinität ( $K_D$ ) von 115 pM (BoNT/A1) beziehungsweise 87 pM (BoNT/A2) generiert (Garcia-Rodriguez *et al.*, 2007). Des Weiteren wurde ein Antikörper (4E17.1) generiert, welcher ein konserviertes Epitop in der Hc von BoNT/A/B/E und F bindet (Kalb *et al.*, 2010).

Während dieser Arbeit wurden zwei anti-BoNT/A1 spezifische Antikörper generiert, welche im ELISA die leichte Kette von BoNT/A1 und BoNT/E3 binden. Hierbei handelte es sich um die Makaken Antikörper SEM95-C6 und SEM95-G8. Obwohl das für beide Antikörper bestimmte Epitop bis auf zwei Aminosäuren in BoNT/B vorkommt, wurde keine Kreuzreaktivität zu BoNT/B festgestellt. Jedoch betrug die Abweichung zu der Sequenz von BoNT/E3 ebenfalls 2 Aminosäuren. Die Affinität ( $K_D$ ) von SEM95-C6 betrug 0,86 nM (BoNT/A1) sowie 10,1 nM (BoNT/E3) und für SEM95-G8 betrug die gemessene  $K_D$  4,5 nM (BoNT/A1) beziehungsweise 8,2 nM (BoNT/E3). Obwohl SEM95-G8 die Toxizität von BoNT/A1 im *ex vivo* Assay neutralisierte und ebenfalls mit hoher Affinität BoNT/E3 gebunden hat, wurde im *ex vivo* Assay mit BoNT/E3 keine Neutralisation der Toxin-assoziierten Paralyse gemessen. Der geringe Unterschied in der Sequenz von Serotyp A und E waren ausschlaggebend für die fehlende Kreuzneutralisation der unterschiedlichen Serotypen. Dies verdeutlicht die Schwierigkeit Antikörper zu generieren, welche mehrere Serotypen von BoNT binden und zudem deren Toxizität neutralisieren.

Des Weiteren wurden die Sequenzen der leichten Kette von BoNT/A/B und E auf Homologe Regionen untersucht und für die Antikörperselektion verwendet. Eine dieser Sequenzen (FNYKDPVN, BoNT/A1), welche auf der Oberfläche von BoNT zu finden ist, wurde für die Selektion kreuzreaktiver Antikörper verwendet. Für die Antikörperselektion wurden 3 unterschiedliche Immunbibliotheken gegen BoNT/A/B und E sowie die humane naive Antikörpergenbibliothek HAL9/10 (Kügler *et al.*, *in preparation*) verwendet. Die humane Antikörpergenbibliothek HAL9/10 ist mit einer Diversität von  $1 \times 10^{10}$  individuelle Antikörperklone für HAL9 und  $5 \times 10^9$  für HAL10 komplexer als die Makaken Immunbibliotheken, die eine Diversität von  $3,2 \times 10^8$  (BoNT/A-L),  $4,3 \times 10^8$  (BoNT/B-L) sowie  $9,6 \times 10^8$  (BoNT/E-L) individuelle Antikörperklonen aufweisen. Obwohl die Diversität von Immunbibliotheken meist niedriger als die von qualitativen naiven Antikörpergenbibliotheken ist, beinhalten Immunbibliotheken diverse Antikörper gegen unterschiedliche Epitope für das zur Immunisierung verwendeten Antigen (Moon *et al.*, 2011). Jedoch setzt dies voraus, dass die entsprechenden Epitope vom Immunsystem erkannt

werden und eine Immunreaktion hervorrufen. Interessanterweise wurden mit den Immunbibliotheken keine Antikörperphagen gegen das Peptid (FNYKDPVN) angereichert. Dies deutet daraufhin, dass während der Immunisierung der Makaken keine Antikörper gegen diese Sequenz generiert wurden und es sich womöglich um eine nicht-immunogene Sequenz handelte. Lediglich mit HAL9/10 gelang die Selektion von Antikörpern gegen die verwendete Peptidsequenz. Naive Antikörpergenbibliotheken beinhalten ein umfassendes Spektrum an V-Genfamilien und durch die zufällige Kombination der VH- und VL-Gene wird die Diversität an Antikörpern zusätzlich erhöht, so sind theoretisch Antikörper gegen nahezu jedes Antigen möglich (Schwimmer *et al.*, 2013). Die für die Antikörperselektion verwendete Sequenz unterschied sich zwar geringfügig innerhalb der Serotypen A/B und E, jedoch hat der aus der HAL9/10 stammende Antikörper (SEM253.7-C6) die Peptide der jeweiligen Serotypen im ELISA gebunden. Im ELISA gegen die jeweiligen rekombinanten leichten Ketten der Serotypen A/B und E war jedoch SEM253.7-C6 lediglich spezifisch gegen Serotyp A und begrenzt gegen Serotyp E. Dies deutet daraufhin, dass, obwohl die jeweiligen Sequenzen als Peptid gebunden wurden, die natürliche Konformation des Antigens die Bindung von SEM253.7-C6 beeinträchtigt. Zudem ergaben *ex vivo* Analysen, dass das hier beschriebene Epitop nicht zu einer Neutralisierung der Toxizität von BoNT/A1 führt. Mehr noch, durch die Antikörper-Toxin-Bindung kam es zu einer leicht beschleunigten Paralyse, welches die Schlussfolgerung zulässt, dass die Antikörperbindung zu einer Konformationsänderung von BoNT/A1 führt und die Toxizität leicht erhöht wird. Derartige Beobachtungen im Bezug auf BoNT wurden bereits für andere Antikörper beschrieben (Sheridan *et al.*, 2001).

### 4.5 Humanisierung des anti-BoNT/A1 spezifischen Antikörpers SEM120-IIIC1

Für therapeutische Applikationen von rekombinanten Antikörpern in Menschen ist zusätzlich zu deren Affinität zum jeweiligen Antigen dessen potenzielle Immunogenität von Bedeutung. Ein Indiz für die Immunogenität von nicht-humanen Proteinen bietet der Vergleich mit entsprechenden humanen Proteinen. Je ähnlicher sich diese sind, um so geringer ist die Wahrscheinlichkeit, dass eine Immunantwort hervorgerufen wird (De Groot & Moise, 2007). Eine Möglichkeit den Grad der Unterschiede zwischen nicht-humanen und humanen Antikörpern zu bestimmen bietet der *Germinality Index* (GI). Hierbei wird die Aminosäuresequenz der *framework* Regionen der nicht-humanen Antikörper mit denen der durch die humanen Keimbahnlinien codierten *framework* Regionen verglichen und in Prozent dargestellt. Der *Germinality Index* des Makaken Antikörpers SEM120-IIIC1 betrug 86,8 % (VH) und 87,6 % (VL) und entspricht dem durchschnittlichen GI von 100 Makaken scFv aus unterschiedlichen Immunbibliotheken (87,7 % (VH), 87,1 % (VL)). Hingegen lag der ermittelte GI von 500 scFv aus der humanen naiven Antikörpergenbibliothek



HAL7/8 (Hust *et al.*, 2011) im Durchschnitt bei 96,6 % (VH) und 94,8 % (VL), jedoch gelten prinzipiell sämtliche aus einer humanen Antikörpergenbibliothek generierten Antikörper als human (Abhinandan & Martin, 2007). Die hohe Übereinstimmung zwischen Antikörpern von nicht-humanen Primaten und den entsprechenden humanen Antikörpern wurde bereits in unterschiedlichen Studien belegt (Andris *et al.*, 1997; Kawamura *et al.*, 1992). Eine endgültige Aussage über die Immunogenität und Toleranz nicht-humaner Antikörper im Menschen kann jedoch erst in klinischen Phasen erfolgen. Allerdings deuten Studien daraufhin, dass chimäre Antikörper (Makake-Mensch), wie Lumiliximab, eine gute Immuntoleranz aufweisen (Pathan *et al.*, 2004; Rosenwasser *et al.*, 2003).

In der vorliegenden Arbeit wurde der Makaken Antikörper SEM120-IIIC1 humanisiert. Hierfür wurden zunächst die Aminosäuren der *framework* Regionen mit den humanen Keimbahnlagen verglichen und schrittweise der humanen Sequenz angeglichen. SEM120-IIIC1 unterschied sich von der humanen Sequenz mit der höchsten Übereinstimmung in den *framework* Regionen um jeweils 12 AS (VH) beziehungsweise 11 AS (VL). Bei den insgesamt 23 AS handelt es sich entweder um somatische Hypermutationen oder Abweichungen zwischen den Makaken und humanen Keimbahnlagen. Beides kann im Menschen zu einer Immunantwort führen und die Verträglichkeit des Präparates reduzieren. Um die potenzielle Immunogenität zu reduzieren, wurden systematisch die jeweiligen Aminosäuren in den *framework* Regionen ausgetauscht und diese der humanen Sequenz angeglichen. Der Ansatz der systematischen Humanisierung wird auch als *Super-Humanization* beziehungsweise *Germlinization* bezeichnet (Tan *et al.*, 2002; Hwang *et al.*, 2005; Pelat *et al.*, 2008). Zunächst wurden hierbei die von der humanen Sequenz abweichenden Aminosäuren mittels der IMGT Aminosäuren Klassifizierung nach ihren biochemischen Eigenschaften in 'sehr ähnliche' bis hin zu 'sehr unähnliche' AS eingeordnet (Pommié *et al.*, 2004) und schrittweise die 'sehr ähnlichen' beziehungsweise 'sehr unähnlichen' AS ausgetauscht. Der Einfluss der jeweiligen AS auf die Struktur der variablen Domänen wurde mittels WAM (*Web Antibody Modelling*) analysiert (Whitelegg & Rees, 2000). Dieses Programm bietet einen Algorithmus um die voraussichtliche 3D Struktur der variablen Domänen zu bestimmen. Anhand von WAM wurde prognostiziert, dass der AS-Austausch V21>L zu einer Strukturveränderung in der CDR3 der schweren Kette führt. Daraufhin wurden sämtliche weiteren humanisierten Varianten ohne den AS-Austausch V21>L generiert, welches laut WAM die Struktur der variablen Domäne nicht weiterhin beeinflusste. Die tatsächliche Bindungseigenschaften der humanisierten Varianten wurde mittels Antigen-ELISA sowie SPR-Spektroskopie überprüft. Mit den AS-Austausch (VH) der 'unähnlichen AS' ((V5>E (FR1-IMGT), H40>T, I55>W (FR2-IMGT), Y88>F (FR3-IMGT)) und 'sehr unähnlichen AS' ((A17>T (FR1-IMGT), G49>V (FR2-IMGT), S66>D, S92>N

(FR3-IMGT), T122>V (FR4-IMGT)) wurde die Antikörper-Antigen-Bindung verschlechtert. Zudem konnte für diese Varianten mittels SPR-Analyse keine Affinität ( $K_D$ ) zu BoNT/A1 gemessen werden. Die vollständige Humanisierung der leichten Kette hatte hingegen keinen negativen Effekt auf die Bindungseigenschaften der Antikörper. Die Affinität ( $K_D$ ) des Makaken Antikörpers SEM120-IIIC1 betrug 0,82 nM. Die Affinität ( $K_D$ ) der humanisierten Variante hu8SEM120-IIIC1, bei der sämtlichen AS in den *framework* Regionen der VL sowie die 'ähnlichen AS' (ausser V21>L) der VH ausgetauscht wurden, betrug 1,41 nM und lag damit im Messbereich der nicht-humanisierten Variante. Der *Germinality Index* (GI) von SEM120-IIIC1 betrug 87,2 % (86,8 % (VH), 87,6 % (VL)). Mittels *Germlinization* wurde der GI von hu8SEM120-IIIC1 auf 94,5 % (89 % (VH), 100 % (VL)) verbessert. Dieser Wert ist vergleichbar mit den GI von 500 Antikörpern aus der humanen Antikörpergenbibliothek HAL7/8 (95,7 % (VH+VL)). Somit ist anzunehmen, dass hu8SEM120-IIIC1 keine beziehungsweise nur in seltenen Fällen eine Immunantwort im Menschen hervorruft und theoretisch als Humantherapeutikum geeignet ist. Zudem wurde im *ex vivo Nervus phrenicus hemidiaphragma* Assay kein signifikanter Unterschied bezüglich der Toxin-Neutralisation von SEM120-IIIC1 und hu8SEM120-IIIC1 als IgG (30 µg/mL) gemessen. Die 50 % Paralysezeit von BoNT/A1 (20LD<sub>50</sub>) mit SEM120-IIIC1 betrug 157 min, die von hu8SEM120-IIIC1 154 min.

Die Konvertierung von SEM120-IIIC1 in das IgG-Format führte jedoch im Vergleich zum scFv-Fc-Format zu einer leichten Reduzierung der 50 % Paralysezeit. So betrug die 50 % Paralysezeit von SEM120-IIIC1 als scFv-Fc-Antikörper 200 min (30 µg/mL (267 nM)) beziehungsweise im IgG-Format 159 min (40 µg/mL (267 nM)). Dies konnte ebenfalls für SEM120-IID5 nachgewiesen werden (202 min als scFv-Fc, 149 min als IgG). Dies lässt darauf schließen, dass durch die Konvertierung in das IgG-Format die Antigen-Bindung beziehungsweise Toxin-Neutralisation beeinträchtigt wird. Eine Reduzierung der Affinität nach der Konvertierung aus dem scFv-beziehungsweise scFv-Fc-Format in das IgG-Format wurde bereits für andere Antikörper beschrieben (Thie *et al.*, 2011). Eine Mögliche Ursache könnte sein, dass im scFv-Fc-Format die variablen Domänen durch die *Linker* Region eine höhere Flexibilität gegenüber dem IgG-Format aufweisen sowie ein veränderter Winkel von VH zu VL die Bindungseigenschaften beeinträchtigt.

Für eine detailliertere Analyse der AS-Austausche ('unähnliche AS') in der VH, welche zu einer verschlechterten Affinität zu BoNT/A1 führten sowie dem AS-Austausch V21>L, wurden die jeweiligen AS einzeln ausgetauscht und ihr Einfluss auf die Antigenbindung von BoNT/A1 untersucht. Da sich diese Varianten schlecht beziehungsweise nicht als scFv-Fc produzieren liessen, wurden sämtliche Varianten als scFv-Phagen produziert, im Antigen-ELISA auf BoNT/A1-L analysiert und mit SEM120-IIIC1 verglichen. Im Vergleich zu hu8SEM120-IIIC1 wurde kein

Unterschied in der Antigenbindung von hu8SEM120-IIIC1/V21>L festgestellt. Dies steht im Kontrast zu der *in silico* Analyse (WAM), wonach V21>L zu einer Strukturänderung der CDR3 (VH) führt, was vermutlich eine verschlechterte Antigenbindung zur Folge hätte. Des Weiteren wurde der AS-Austausch I55>W identifiziert, welcher als scFv-Phage zu einer verschlechterten Antigenbindung führte. Die mittels WAM generierte 3D Struktur von VH legte nahe, dass der AS-Austausch I55>W an den CDRs angrenzt und womöglich einen direkten Einfluss auf die Stabilität der CDRs hat. Zur Validierung der Ergebnisse als scFv-Phagen wurden die beiden AS-Austausche V21>L und I55>W einzeln und in Kombination als IgG im *ex vivo Nervus phrenicus hemidiaphragma* Assay auf ihren Einfluss auf die Toxin-Neutralisation hin untersucht und mit dem Makaken Antikörper SEM120-IIIC1 verglichen. Die Antikörperkonzentration betrug hierbei für jeden Variante 30 µg/mL. Die 50 % Paralysezeit von SEM120-IIIC1 betrug 157 min beziehungsweise 154 min für hu8SEM120-IIIC1. Durch den AS-Austausch V21>L reduzierte sich die 50 % Paralysezeit für hu8SEM120-IIIC1/V21>L auf 128 min. Dies lässt darauf schließen, dass der AS-Austausch an Position V21>L wesentlich zur Antigenbindung beiträgt und das Ergebnis der *in silico* Analyse (WAM) bestätigt wurde. Die Antigenbindung als scFv-Phage beruhte möglicherweise auf den Aviditätseffekt. Durch den verwendeten Helferphagen (Hyperphage) werden mehrere scFv auf den Phagen präsentiert und ein mögliche Verringerung der Affinität entgegengewirkt (Broders *et al.*, 2003). Der Einfluss der Avidität auf niedrig-affine Antikörper wurde beispielsweise für den anti-Her2 spezifischen scFv G98A belegt. Durch die Konvertierung von G98A in ein bivalentes Antikörper-Format (*diabody*) wurde die apparente Affinität von 361 nM auf 5,6 nM verbessert (Nielsen *et al.*, 2000). Bei der humanisierten Variante hu12SEM120-IIIC1/I55>W führte der AS-Austausch I55>W gegenüber hu12SEM120-IIIC1 zu einer leichten Verbesserung der 50 % Paralysezeit von 114 min auf 121 min. Dies entspricht den Ergebnissen als scFv-Phage, bei den ebenfalls ein verbesserte Antigenbindung im ELISA gemessen wurde. Hingegen führte die zusätzliche Mutation (V21>L) in hu12SEM120-IIIC1/I55>W/V21>L zur Verschlechterung der 50 % Paralysezeit auf 115 min.

Die Humanisierung von SEM120-IIIC1 verdeutlicht, dass die Antigenbindung nicht allein von den CDRs abhängt und ein Transfer der CDRs in ein humanes *framework* mit einem Verlust an Affinität verbunden sein kann. Einzelne AS im *framework* können zumal ein Resultat der somatischen Hypermutation sein und wesentlich zur Stabilisierung der CDRs und somit zur Antigenbindung beitragen. Zudem existieren kanonische AS in den CDRs beziehungsweise in den *framework* Regionen, welche eine Schlüsselposition in der strukturellen Ausbildung der CDRs aufweisen (Clark *et al.*, 2014). Allerdings ergab die Humanisierung eines anti-CD28 Antikörpers, bei denen die Strukturrelevante kanonische AS ohne zusätzliche Rückmutationen in das humane *framework*

übernommen wurden, eine bis zu 30-fach geringere Affinität (Tan *et al.*, 2002).

### **4.6            Protektivität der anti-BoNT/A1 IgG im *in vivo* Paralyse Assay sowie im *in vivo* Maus Letalitäts Assay**

Um das therapeutische Potential diverser Antikörper zu validieren, muss deren Wirkung im Organismus belegt werden. Ein Ansatz zur Bestimmung der Antikörper-vermittelte Toxin-Neutralisation von BoNT/A1 ist das nicht-letale *in vivo* Paralyse Assay (Jones *et al.*, 2006) sowie das Maus Letalitäts Assay (Mazuet *et al.*, 2010). Zusätzlich zu hu8SEM120-IIIC1 wurde für die *in vivo* Studien der Antikörper hu8A1Hc38 verwendet. Hierbei handelte es sich um einen aus einer Makaken Immunbibliothek generierten und mittels *Germlinization* humanisierten Antikörper, der die schwere Kette von BoNT/A1 bindet und im *ex vivo* *Nervus phrenicus hemidiaphragma* Assay die Toxizität von BoNT/A1 neutralisiert (AntiBotABE). Der *Geminality Index* des ursprünglichen Makaken Antikörpers A1Hc38 betrug 83,3 % (VH) und 86,5 % (VL), mittels *Germlinization* wurde der GI von hu8A1Hc38 auf 93,3 % (VH) und 94,4 % (VL) verbessert. Im *in vivo* Paralyse Assay (0,4LD<sub>50</sub> BoNT/A1) erwies sich hu8A1Hc38 bei einer Konzentration bis zu 10 µg/Dosis als neutralisierend beziehungsweise bei einer Konzentration von 1 µg/Dosis noch als protektiv. Hingegen war hu8SEM120-IIIC1 bei einer Konzentration von 1-100 µg/Dosis protektiv, vermochte jedoch nicht die Toxizität von BoNT/A1 *in vivo* vollständig zu neutralisieren. Bemerkenswert war jedoch ein eintretender Synergieeffekt beider Antikörper, der zu einer vollständigen Neutralisation von BoNT/A1 bei einer Konzentration von 0,25 µg/Dosis führte. Dieser Synergieeffekt wurde auch im *in vivo* Maus Letalitäts Assay (5MLD<sub>50</sub> BoNT/A1) nachgewiesen. Hierbei überlebten sämtliche Versuchstiere eine Intoxikation mit BoNT/A1 bei einer Antikörperkonzentration von je 2,5 µg/Maus (hu8SEM120-IIIC1 und hu8A1Hc38). Selbst bei einer Antikörperkonzentration von 250 ng/Maus überlebte die Hälfte der Versuchstiere. Hu8A1Hc38 bindet die schwere Kette von BoNT/A1 und inhibiert die Toxin-Internalisierung, während hu8SEM120-IIIC1 die Endopeptidase Aktivität von BoNT/A1 inhibiert und erst nach der Toxin-Internalisierung protektiv wirkt. Beide Antikörper bieten zusammen ein vielversprechenden therapeutischen Ansatz zur Behandlung einer BoNT-Intoxikation.

### **4.7            Ausblick**

Im Rahmen des AntiBotABE Projektes ist hu8SEM120-IIIC1 als Bestandteil eines oligoklonalen Präparates vorgesehen, welches die Toxizität der 3 für den humanen Botulismus verantwortlichen Serotypen A,B und E neutralisiert. Bis zu einem möglichen therapeutischen Einsatz, der in dieser

Arbeit generierten Antikörper, muss jedoch deren Protektivität und Verträglichkeit in weiteren Studien untersucht werden. Zudem ist ein Vergleich zu bereits verfügbaren Präparaten erforderlich, um die Vorteile beziehungsweise Nachteile abzuwägen. Dazu gehört neben der Wirksamkeit des Antikörperpräparates bei unterschiedlichen Toxinkonzentrationen die potenzielle Immunogenität und Autoreaktivität mit humanen Proteinen sowie dessen Stabilität und die pro Behandlung anfallenden Kosten. Da sich die Humanisierung der variablen Domänen an den humanen Keimbahnlinien orientierte, ist von einer guten Immuntoleranz auszugehen. Um die Komplexität des oligoklonalen Antikörperpräparates sowie die Produktionskosten zu minimieren, wäre die Verwendung von bispezifischen Antikörperformaten interessant. Dies gilt besonders für hu8SEM120-IIIC1 und hu8A1Hc38, welche zusammen bereits einen Synergieeffekt im *in vivo* Paralyse Assay sowie im *in vivo* Maus Letalitäts Assay aufwiesen. Die Wirksamkeit eines solchen bispezifischen Präparates muss im Vergleich zu den jeweiligen ursprünglichen Antikörpern neu erbracht werden. Weiterhin müsste bezüglich hu8SEM120-IIIC1 eine mögliche Internalisierung sowie interzelluläre Neutralisierung von BoNT/A1 untersucht werden. Für diagnostische Zwecke eignen sich besonders die Antikörper, welche die Toxizität von BoNT/A1 nicht neutralisieren. Diese können in diversen Assays eingesetzt werden und zum Nachweis beziehungsweise zur Qualitätskontrolle von BoNT dienen. Der Nachweis von BoNT erfolgt entweder mittels Maus-Protektions-Assays beziehungsweise dem Hemidaphragma Assay, diese benötigen jedoch ein hohes Mass an Versuchstieren und sind zudem zeitaufwendig. Eine Alternative sind ELISA-basierende Detektionssysteme, welche zusätzlich zwischen den jeweiligen Serotypen unterscheiden. Beispielsweise wurde zur Detektion von 10 unterschiedliche Toxine ein ELISA Microarray Assay entwickelt, welcher auch BoNT nachweist (Jenko *et al.*, 2014).

## 5 Zusammenfassung

Botulismus ist eine akute, lebensbedrohliche Erkrankung, welche zumeist mit einer Lebensmittelvergiftung assoziiert wird. Auslöser hierfür ist die Intoxikation mit unterschiedlichen Botulinum Neurotoxinen, welche von *Clostridium botulinum* und weiteren *Clostridium spp.* sekretiert werden. Sämtliche bisher bekannten Botulinum Neurotoxine werden in 8 Serotypen (A-H) unterteilt, von denen hauptsächlich die Serotypen A, B, E und in seltenen Fällen Serotyp F für den humanen Botulismus verantwortlich sind. Aufgrund ihrer Toxizität wurden BoNTs vom *Centers of Disease Control and Prevention* (CDC) als potenzielle Biowaffen der Kategorie A klassifiziert und zählen zu den 6 Agenzien mit der höchsten Risikobewertung. Besonders BoNT/A gilt als die giftigste Substanz mit einem LD<sub>50</sub> Wert (Letale Dosis) von 1 ng/kg intravenöser und subkutaner Applikation beziehungsweise 3 ng/kg pulmonaler Applikation. Bisherige Therapieansätze beruhen auf einer passiven Immunisierung mit Pferdeantiserum beziehungsweise im Fall von Säuglingsbotulismus mit dem humanen Antikörperpräparat BabyBig®. Allerdings sind die Vorräte des Humanpräparates limitiert und die Verwendung von Pferdeantiserum birgt das Risiko einer Hypersensitivitätsreaktion. Ziel dieser Arbeit war die Generierung neutralisierender Antikörper gegen BoNT/A1. Ausgangspunkt war die Immunisierung eines Makaken mit der rekombinanten leichten Kette von BoNT/A1 und die anschließende Generierung einer Antikörpergenbibliothek zur Selektion von BoNT/A1 spezifischer Antikörper mittels der Phagen Display Technologie. Anschließend wurde der Antikörper mit der besten Toxin-Neutralisation mittels *Germlinization* humanisiert, um dessen potenzielle Immunogenität für den therapeutischen Einsatz im Menschen zu minimieren. Aus der Antikörpergenbibliothek wurden 22 Antikörper selektiert, von denen 7 die Toxizität von BoNT/A1 im *ex vivo Nervus phrenicus hemidiaphragma* Assay neutralisierten. Von den 7 Antikörpern war SEM120-IIIC1 der vielversprechendste Kandidat und wurde mittels *Germlinization* humanisiert. Durch die Humanisierung von SEM120-IIIC1 wurde der *Germinality Index* (GI) von insgesamt 87,2 % auf 94,5 % gesteigert, welches im Durchschnitt dem GI der aus der humanen Antikörpergenbibliothek HAL7/8 stammenden Antikörper entspricht. Die Antigenbindung von SEM120-IIIC1 zu BoNT/A1 wurde durch die Humanisierung nicht beeinträchtigt. So betrug die Affinität von SEM120-IIIC1 als scFv-Fc 0,82 nM. Der entsprechende humanisierte Antikörper hu8SEM120-IIIC1 besaß ebenfalls als scFv-Fc eine Affinität von 1,41 nM. Des Weiteren war hu8SEM120-IIIC1 als IgG bei einer Konzentration von 1 µg/Dosis im *in vivo* Paralyse Assay mit BoNT/A1 (0,4LD<sub>50</sub>) protektiv sowie stellte sich ein Synergieeffekt bei einer Kombination mit hu8A1Hc38 ein, bei dem beide Antikörper bei einer Konzentration von 0,25 µg/Dosis die Toxizität von BoNT/A1 vollständig neutralisierten. Dieser Synergieeffekt wurde im *in vivo* Maus Letalitäts Assay bestätigt, bei dem sämtliche Versuchstiere eine Intoxikation von BoNT/A1 (5MLD<sub>50</sub>) bei

einer Antikörperkonzentration von 2,5 µg/Maus überlebten. Beide Antikörper eignen sich somit für die klinische Weiterentwicklung im Rahmen eines oligoklonalen Präparates zur Behandlung einer Intoxikation mit BoNT/A/B und E (AntiBotABE).

## 6 Summary

Botulism is a life-threatening disease associated with foodborne poisoning caused by an intoxication of several Botulinum neurotoxins (BoNTs) that are secreted by *Clostridium botulinum* and certain other *Clostridium spp.*. To date, there are 8 serologically distinct serotypes (designated A to H) of BoNT known. Four BoNT serotypes (A, B, E and rarely F) are mainly responsible for human botulism. Due to the high toxicity BoNTs are classified as category A agents by the Centers for Disease Control and Prevention (CDC) and are among of the six agents with the highest risk of potential use as bioweapons. Botulinum neurotoxin A is the most toxic substance on earth with LD<sub>50</sub> values (lethal dose) of 1 ng/kg by the intravenous and subcutaneous routes and 3 ng/kg by the pulmonary route. The current approach for the treatment of botulism is based on passive immunization with equine anti-toxin serum or in case of infant botulism with human anti-botulism immunoglobulines, such as BabyBig®. Nevertheless, the use of equine anti-toxin serum may cause hypersensitivity and serumsickness and the human serum stock of BabyBig® is limited. Aim of this work was the development of neutralizing antibodies against BoNT/A1. Therefore, a male macaque was immunized with recombinant light chain of BoNT/A1. Afterwards, an immune phage display library was constructed and used for selection of BoNT/A1 specific antibodies. For further development of immunotherapeutics the most promising antibody was humanized via germlinization to minimize whose potential immunogenicity. After multi-step panning 22 scFv were selected. Seven antibodies were neutralizing in the *ex vivo* phrenic nerve-hemidiaphragm assay. SEM120-IIIC1 was the most promising candidate for further development and was used for humanization. The human-like nature of this antibody, given by the germinality index (GI), was increased by germlinization from 87.2 % up to 94.5 %. This value correlates with the average GI of antibodies selected from the human naïve antibody gene library HAL7/8. It was shown that the affinity of SEM120-IIIC1 was not significantly changed by humanization. The affinity of the macaque antibody as scFv-Fc was 0.82 nM and correlates with the affinity of the humanized antibody hu8SEM120-IIIC1 (1.41 nM). Furthermore, hu8SEM120-IIIC1 was partially protective *in vivo* paralysis assay (0.4LD<sub>50</sub> BoNT/A1) as IgG at 1 µg/dose and a synergistic effect was observed in combination with hu8A1Hc38. Both antibodies are completely protective *in vivo* against BoNT/A1 at 0.25 µg/dose per antibody. The synergistic effect was clarified using the *in vivo* mouse lethality assay. Here, all animals treated with BoNT/A1 (5MLD<sub>50</sub>) survived after medication with 2.5 µg/mouse of hu8SEM120-IIIC1 and hu8A1Hc38. Both antibodies are suitable for further clinical development as part of an oligoclonal drug for treatment of BoNT/A/B and E intoxication (AntiBotABE).



## 7 Literaturverzeichnis

- Abhinandan, K. R. & Martin, A. C. R.. (2007).** Analyzing the ‘degree of humanness’ of antibody sequences. *J Mol Biol* **369**, 852–862.
- Adekar, S. P., Takahashi, T., Jones, R. M., Al-Saleem, F. H., Ancharski, D. M., Root, M. J., Kapadnis, B. P., Simpson, L. L. & Dessain, S. K.. (2008).** Neutralization of botulinum neurotoxin by a human monoclonal antibody specific for the catalytic light chain. *PloS One* **3**, e3023.
- Amatsu, S., Sugawara, Y., Matsumura, T., Kitadokoro, K. & Fujinaga, Y.. (2013).** Crystal Structure of Clostridium botulinum Whole Hemagglutinin Reveals a Huge Triskelion-shaped Molecular Complex. *J Biol Chem* **288**, 35617–35625.
- Amersdorfer, P., Wong, C., Chen, S., Smith, T., Deshpande, S., Sheridan, R., Finnern, R. & Marks, J. D.. (1997).** Molecular characterization of murine humoral immune response to botulinum neurotoxin type A binding domain as assessed by using phage antibody libraries. *Infect Immun* **65**, 3743–3752.
- Amersdorfer, P., Wong, C., Smith, T., Chen, S., Deshpande, S., Sheridan, R. & Marks, J. D.. (2002).** Genetic and immunological comparison of anti-botulinum type A antibodies from immune and non-immune human phage libraries. *Vaccine* **20**, 1640–1648.
- Andris, J. S., Miller, A. B., Abraham, S. R., Cunningham, S., Roubinet, F., Blancher, A. & Capra, J. D.. (1997).** Variable region gene segment utilization in rhesus monkey hybridomas producing human red blood cell-specific antibodies: predominance of the VH4 family but not VH4-21 (V4-34). *Mol Immunol* **34**, 237–253.
- Arnon, S. S., Schechter, R., Inglesby, T. V., Henderson, D. A., Bartlett, J. G., Ascher, M. S., Eitzen, E., Fine, A. D., Hauer, J. & other authors. (2001).** Botulinum toxin as a biological weapon: medical and public health management. *JAMA J Am Med Assoc* **285**, 1059–1070.
- Arnon, S. S., Payne, J. R., Drummond, Y. & Barash, J. R.. (2008).** Human botulism immune globulin for the treatment of infant botulism: The first four years post-licensure. *Toxicon* **51**, Supplement, 8–9.
- Avril, A., Froude, J. W., Mathieu, J., Pelat, T. & Thullier, P.. (2013).** Isolation of antibodies from non-human primates for clinical use. *Curr Drug Discov Technol*.
- Barash, J. R. & Arnon, S. S.. (2014).** A Novel Strain of Clostridium botulinum That Produces Type B and Type H Botulinum Toxins. *J Infect Dis* **209**, 183–191.
- Barbas III, C. F.. (2001).** *Phage Display: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Beck, A. & Reichert, J. M.. (2013).** Antibody-drug conjugates: Present and future. *mAbs* **6**, 15–17.

- Beckman, R. A., Weiner, L. M. & Davis, H. M.. (2007).** Antibody constructs in cancer therapy: protein engineering strategies to improve exposure in solid tumors. *Cancer* **109**, 170–179.
- Behring, E. & Kitasato, S.. (1890).** Über das Zustandekommen der Diphtherie-Immunität und der Tetanus-Immunität bei Thieren. *DMW* **16**, 1113–1114.
- Bellet, D. & Dangles-Marie, V.. (2005).** [Humanized antibodies as therapeutics]. *Médecine Sci MS* **21**, 1054–1062.
- Bhatia, K. P., Münchau, A., Thompson, P. D., Houser, M., Chauhan, V. S., Hutchinson, M., Shapira, A. H. V. & Marsden, C. D.. (1999).** Generalised muscular weakness after botulinum toxin injections for dystonia: a report of three cases. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **67**, 90–93.
- Bigalke, H. & Frevert, J.. (2012).** Botulinum toxin A: dose and immune response. *Int J Rehabil Res Int Z Für Rehabil Rev Int Rech Réadapt* **35**, 93.
- Bird, R. E., Hardman, K. D., Jacobson, J. W., Johnson, S., Kaufman, B. M., Lee, S. M., Lee, T., Pope, S. H., Riordan, G. S. & Whitlow, M.. (1988).** Single-chain antigen-binding proteins. *Science* **242**, 423–426.
- Black, J. D. & Dolly, J. O.. (1986).** Interaction of 125I-labeled botulinum neurotoxins with nerve terminals. I. Ultrastructural autoradiographic localization and quantitation of distinct membrane acceptors for types A and B on motor nerves. *J Cell Biol* **103**, 521–534.
- Black, R. E. & Gunn, R. A.. (1980).** Hypersensitivity reactions associated with botulinal antitoxin. *Am J Med* **69**, 567–570.
- Boder, E. T., Raeeszadeh-Sarmazdeh, M. & Price, J. V.. (2012).** Engineering antibodies by yeast display. *Arch Biochem Biophys* **526**, 99–106.
- Boulianne, G. L., Hozumi, N. & Shulman, M. J.. (1984).** Production of functional chimaeric mouse/human antibody. *Nature* **312**, 643–646.
- Brams, P., Black, A., Padlan, E. A., Hariharan, K., Leonard, J., Chambers-Slater, K., Noelle, R. J. & Newman, R.. (2001).** A humanized anti-human CD154 monoclonal antibody blocks CD154-CD40 mediated human B cell activation. *Int Immunopharmacol* **1**, 277–294.
- Breitling, F., Dübel, S., Seehaus, T., Klewinghaus, I. & Little, M.. (1991).** A surface expression vector for antibody screening. *Gene* **104**, 147–153.
- Breitling, F. & Dübel, S.. (1997).** *Rekombinante Antikörper*. Spektrum Akademischer Verlag.
- Broad, W. J.. (1998, May 26).** SOWING DEATH: A special report.; How Japan Germ Terror Alerted World. *N Y Times*.
- Broders, O., Breitling, F. & Dübel, S.. (2003).** Hyperphage. Improving antibody presentation in phage display. *Methods Mol Biol Clifton NJ* **205**, 295–302.

- Bujak, E., Matasci, M., Neri, D. & Wulhfard, S.. (2014).** Reformatting of scFv antibodies into the scFv-Fc format and their downstream purification. *Methods Mol Biol Clifton NJ* **1131**, 315–334.
- Byrne, M. P. & Smith, L. A.. (2000).** Development of vaccines for prevention of botulism. *Biochimie* **82**, 955–966.
- Carter, J., Zhang, J., Dang, T.-L., Hasegawa, H., Cheng, J. D., Gianan, I., O'Neill, J. W., Wolfson, M., Siu, S. & other authors. (2010).** Fusion partners can increase the expression of recombinant interleukins via transient transfection in 2936E cells. *Protein Sci Publ Protein Soc* **19**, 357–362.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2011).** Notice of CDC's discontinuation of investigational pentavalent (ABCDE) botulinum toxoid vaccine for workers at risk for occupational exposure to botulinum toxins. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* **60**, 1454–1455.
- Chahboun, S., Hust, M., Liu, Y., Pelat, T., Miethe, S., Helmsing, S., Jones, R. G., Sesardic, D. & Thullier, P. (2011).** Isolation of a nanomolar scFv inhibiting the endopeptidase activity of botulinum toxin A, by single-round panning of an immune phage-displayed library of macaque origin. *BMC Biotechnol* **11**, 113.
- Chasteen, L., Ayriss, J., Pavlik, P. & Bradbury, A. R. M.. (2006).** Eliminating helper phage from phage display. *Nucleic Acids Res* **34**, e145.
- Cheng, L. W., Stanker, L. H., Henderson, T. D., Lou, J. & Marks, J. D.. (2009).** Antibody protection against botulinum neurotoxin intoxication in mice. *Infect Immun* **77**, 4305–4313.
- Chen, S.. (2012).** Clinical uses of botulinum neurotoxins: current indications, limitations and future developments. *Toxins* **4**, 913–939.
- Chia, J. K., Clark, J. B., Ryan, C. A. & Pollack, M.. (1986).** Botulism in an adult associated with food-borne intestinal infection with *Clostridium botulinum*. *N Engl J Med* **315**, 239–241.
- Clark, L. A., Demarest, S. J., Eldredge, J., Jarpe, M. B., Li, Y., Simon, K. & van Vlijmen, H. W. T.. (2014).** Influence of canonical structure determining residues on antibody affinity and stability. *J Struct Biol* **185**, 223–227.
- Clark, M.. (2000).** Antibody humanization: a case of the 'Emperor's new clothes'? *Immunol Today* **21**, 397–402.
- Dall'Acqua, W. F., Damschroder, M. M., Zhang, J., Woods, R. M., Widjaja, L., Yu, J. & Wu, H.. (2005).** Antibody humanization by framework shuffling. *Methods San Diego Calif* **36**, 43–60.
- Davis, J. B., Mattman, L. H. & Wiley, M.. (1951).** *Clostridium botulinum* in a fatal wound infection. *J Am Med Assoc* **146**, 646–648.

- Dembek, Z. F., Smith, L. A. & Rusnak, J. M.. (2007).** Botulism: cause, effects, diagnosis, clinical and laboratory identification, and treatment modalities. *Disaster Med Public Health Prep* **1**, 122–134.
- Dolly, J. O., Black, J., Williams, R. S. & Melling, J.. (1984).** Acceptors for botulinum neurotoxin reside on motor nerve terminals and mediate its internalization. *Nature* **307**, 457–460.
- Dong, J., Thompson, A. A., Fan, Y., Lou, J., Conrad, F., Ho, M., Pires-Alves, M., Wilson, B. A., Stevens, R. C. & Marks, J. D.. (2010).** A single-domain llama antibody potently inhibits the enzymatic activity of botulinum neurotoxin by binding to the non-catalytic alpha-exosite binding region. *J Mol Biol* **397**, 1106–1118.
- Dorner, M. B., Schulz, K. M., Kull, S. & Dorner, B. G.. (2013).** Complexity of botulinum neurotoxins: challenges for detection technology. *Curr Top Microbiol Immunol* **364**, 219–255.
- Dover, N., Barash, J. R., Hill, K. K., Xie, G. & Arnon, S. S.. (2014).** Molecular characterization of a novel botulinum neurotoxin type h gene. *J Infect Dis* **209**, 192–202.
- Dübel, S.. (2007).** *Handbook of Therapeutic Antibodies*. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co.
- Duncan, A. R. & Winter, G.. (1988).** The binding site for C1q on IgG. *Nature* **332**, 738–740.
- Edelman, G. M.. (1991).** Antibody Structure and Molecular Immunology. *Scand J Immunol* **34**, 4–22.
- Ehrlich, P.. (1908).** Partial cell functions. Nobel Lecture.
- Eisenbrand, G. & Schreier, P.. (2006).** Lebensmittelchemie, pp. 148–149. Thieme.
- Van Ermengem, E.. (1979).** Classics in infectious diseases. A new anaerobic bacillus and its relation to botulism. E. van Ermengem. Originally published as ‘Ueber einen neuen anaëroben Bacillus und seine Beziehungen zum Botulismus’ in Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheiten 26: 1-56, 1897. *Rev Infect Dis* **1**, 701–719.
- Fagraeus, A.. (1948).** The plasma cellular reaction and its relation to the formation of antibodies in vitro. *J Immunol Baltim Md 1950* **58**, 1–13.
- Friesecke, I., Biederbick, W., Boecken, G., Gottschalk, R., Koch, H.-U., Peters, G., Peters, S., Sassa, J. & Stich, A.. (2007).** *Biologische Gefahr II*, 1st edn. Bonn.
- Froude, J. W., Stiles, B., Pelat, T. & Thullier, P.. (2011).** Antibodies for biodefense. *mAbs* **3**, 517–527.
- Fujinaga, Y., Sugawara, Y. & Matsumura, T.. (2013).** Uptake of botulinum neurotoxin in the intestine. *Curr Top Microbiol Immunol* **364**, 45–59.
- Fu, Z., Chen, S., Baldwin, M. R., Boldt, G. E., Crawford, A., Janda, K. D., Barbieri, J. T. & Kim, J.-J. P.. (2006).** Light chain of botulinum neurotoxin serotype A: structural resolution of a catalytic intermediate. *Biochemistry (Mosc)* **45**, 8903–8911.

- Gao, C., Mao, S., Lo, C. H., Wirsching, P., Lerner, R. A. & Janda, K. D. (1999).** Making artificial antibodies: a format for phage display of combinatorial heterodimeric arrays. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 6025–6030.
- Garcia-Rodriguez, C., Levy, R., Arndt, J. W., Forsyth, C. M., Razai, A., Lou, J., Geren, I., Stevens, R. C. & Marks, J. D. (2007).** Molecular evolution of antibody cross-reactivity for two subtypes of type A botulinum neurotoxin. *Nat Biotechnol* **25**, 107–116.
- Gill, D. M. (1982).** Bacterial toxins: a table of lethal amounts. *Microbiol Rev* **46**, 86–94.
- Goletz, S., Christensen, P. A., Kristensen, P., Blohm, D., Tomlinson, I., Winter, G. & Karsten, U. (2002).** Selection of large diversities of antiidiotypic antibody fragments by phage display. *J Mol Biol* **315**, 1087–1097.
- Green, L. L. (1999).** Antibody engineering via genetic engineering of the mouse: XenoMouse strains are a vehicle for the facile generation of therapeutic human monoclonal antibodies. *J Immunol Methods* **231**, 11–23.
- Grenda, T., Kukier, E. & Kwiatek, K. (2014).** Methods and difficulties in detection of Clostridium botulinum and its toxins. *Pol J Vet Sci* **17**, 195–205.
- Griffiths, A. D., Williams, S. C., Hartley, O., Tomlinson, I. M., Waterhouse, P., Crosby, W. L., Kontermann, R. E., Jones, P. T., Low, N. M. & Allison, T. J. (1994).** Isolation of high affinity human antibodies directly from large synthetic repertoires. *EMBO J* **13**, 3245–3260.
- De Groot, A. S. & Moise, L. (2007).** Prediction of immunogenicity for therapeutic proteins: state of the art. *Curr Opin Drug Discov Devel* **10**, 332–340.
- Gross, J., Moller, R., Henke, W. & Hoesel, W. (2006).** Detection of anti-EPO antibodies in human sera by a bridging ELISA is much more sensitive when coating biotinylated rhEPO to streptavidin rather than using direct coating of rhEPO. *J Immunol Methods* **313**, 176–182.
- Gu, S. & Jin, R. (2013).** Assembly and function of the botulinum neurotoxin progenitor complex. *Curr Top Microbiol Immunol* **364**, 21–44.
- Häfner, S. (2009).** Justinus Kerner's Heroic Experiments with Botulinum Toxin. *Aktuelle Neurol* **36**, 412–417.
- Hale, G., Dyer, M. J., Clark, M. R., Phillips, J. M., Marcus, R., Riechmann, L., Winter, G. & Waldmann, H. (1988).** Remission induction in non-Hodgkin lymphoma with reshaped human monoclonal antibody CAMPATH-1H. *Lancet* **2**, 1394–1399.
- Hatheway, C. L. (1995).** Botulism: the present status of the disease. *Curr Top Microbiol Immunol* **195**, 55–75.
- Hawlich, H., Müller, M., Frank, R., Bautsch, W., Klos, A. & Köhl, J. (2001).** Site-specific anti-C3a receptor single-chain antibodies selected by differential panning on cellulose sheets. *Anal Biochem* **293**, 142–145.

- Hayashi, N., Welschof, M., Zewe, M., Braunagel, M., Dübel, S., Breitling, F. & Little, M.. (1994).** Simultaneous mutagenesis of antibody CDR regions by overlap extension and PCR. *BioTechniques* **17**, 310, 312, 314–315.
- Heng, B. C. & Cao, T.. (2005).** Making cell-permeable antibodies (Transbody) through fusion of protein transduction domains (PTD) with single chain variable fragment (scFv) antibodies: potential advantages over antibodies expressed within the intracellular environment (Intrabody). *Med Hypotheses* **64**, 1105–1108.
- Hibbs, R. G., Weber, J. T., Corwin, A., Allos, B. M., Abd el Rehim, M. S., Sharkawy, S. E., Sarn, J. E. & McKee, K. T.. (1996).** Experience with the use of an investigational F(ab')<sub>2</sub> heptavalent botulism immune globulin of equine origin during an outbreak of type E botulism in Egypt. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* **23**, 337–340.
- Hill, K. K., Smith, T. J., Helma, C. H., Ticknor, L. O., Foley, B. T., Svensson, R. T., Brown, J. L., Johnson, E. A., Smith, L. A. & other authors. (2007).** Genetic diversity among Botulinum Neurotoxin-producing clostridial strains. *J Bacteriol* **189**, 818–832.
- Hill, S. E., Iqbal, R., Cadiz, C. L. & Le, J.. (2013).** Foodborne botulism treated with heptavalent botulism antitoxin. *Ann Pharmacother* **47**, e12.
- Hoet, R. M., Cohen, E. H., Kent, R. B., Rookey, K., Schoonbroodt, S., Hogan, S., Rem, L., Frans, N., Daukandt, M. & other authors. (2005).** Generation of high-affinity human antibodies by combining donor-derived and synthetic complementarity-determining-region diversity. *Nat Biotechnol* **23**, 344–348.
- Holliger, P. & Winter, G.. (1997).** Diabodies: small bispecific antibody fragments. *Cancer Immunol Immunother Cll* **45**, 128–130.
- Holt, L. J., Herring, C., Jespers, L. S., Woolven, B. P. & Tomlinson, I. M.. (2003).** Domain antibodies: proteins for therapy. *Trends Biotechnol* **21**, 484–490.
- Huang, C. C., Meng, E. C., Morris, J. H., Pettersen, E. F. & Ferrin, T. E.. (2014).** Enhancing UCSF Chimera through web services. *Nucleic Acids Res* **42**, W478–484.
- Hust, M., Maiss, E., Jacobsen, H.-J. & Reinard, T.. (2002).** The production of a genus-specific recombinant antibody (scFv) using a recombinant potyvirus protease. *J Virol Methods* **106**, 225–233.
- Hust, M., Jostock, T., Menzel, C., Voedisch, B., Mohr, A., Brenneis, M., Kirsch, M. I., Meier, D. & Dübel, S.. (2007).** Single chain Fab (scFab) fragment. *BMC Biotechnol* **7**, 14.
- Hust, M., Meyer, T., Voedisch, B., Rülker, T., Thie, H., El-Ghezal, A., Kirsch, M. I., Schütte, M., Helmsing, S. & other authors. (2011).** A human scFv antibody generation pipeline for proteome research. *J Biotechnol* **152**, 159–170.

- Hust, M., Frenzel, A., Schirrmann, T. & Dübel, S.. (2014).** Selection of recombinant antibodies from antibody gene libraries. *Methods Mol Biol Clifton NJ* **1101**, 305–320.
- Huston, J. S., Levinson, D., Mudgett-Hunter, M., Tai, M. S., Novotný, J., Margolies, M. N., Ridge, R. J., Brucoleri, R. E., Haber, E. & Crea, R.. (1988).** Protein engineering of antibody binding sites: recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analogue produced in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 5879–5883.
- Hu, W.-G., Jager, S., Chau, D., Mah, D. & Nagata, L. P.. (2010).** Generation of a recombinant full-length human antibody binding to botulinum neurotoxin A. *Appl Biochem Biotechnol* **160**, 1206–1216.
- Hwang, W. Y. K., Almagro, J. C., Buss, T. N., Tan, P. & Foote, J.. (2005).** Use of human germline genes in a CDR homology-based approach to antibody humanization. *Methods San Diego Calif* **36**, 35–42.
- Jäger, V., Büssow, K., Wagner, A., Weber, S., Hust, M., Frenzel, A. & Schirrmann, T.. (2013).** High level transient production of recombinant antibodies and antibody fusion proteins in HEK293 cells. *BMC Biotechnol* **13**, 52.
- Janeway. (2009).** *Janeway Immunologie*.
- Jenko, K. L., Zhang, Y., Kostenko, Y., Fan, Y., Garcia-Rodriguez, C., Lou, J., Marks, J. D. & Varnum, S. M.. (2014).** Development of an ELISA microarray assay for the sensitive and simultaneous detection of ten biodefense toxins. *The Analyst*.
- Jones, R. G. A., Alsop, T.-A., Hull, R., Tierney, R., Rigsby, P., Holley, J. & Sesardic, D.. (2006).** Botulinum type A toxin neutralisation by specific IgG and its fragments: a comparison of mouse systemic toxicity and local flaccid paralysis assays. *Toxicon Off J Int Soc Toxinology* **48**, 246–254.
- Jones, R. G. A., Ochiai, M., Liu, Y., Ekong, T. & Sesardic, D.. (2008).** Development of improved SNAP25 endopeptidase immuno-assays for botulinum type A and E toxins. *J Immunol Methods* **329**, 92–101.
- Kalb, S. R., Lou, J., Garcia-Rodriguez, C., Geren, I. N., Smith, T. J., Moura, H., Marks, J. D., Smith, L. A., Pirkle, J. L. & Barr, J. R.. (2009).** Extraction and inhibition of enzymatic activity of botulinum neurotoxins/A1, /A2, and /A3 by a panel of monoclonal anti-BoNT/A antibodies. *PLoS One* **4**, e5355.
- Kalb, S. R., Garcia-Rodriguez, C., Lou, J., Baudys, J., Smith, T. J., Marks, J. D., Smith, L. A., Pirkle, J. L. & Barr, J. R.. (2010).** Extraction of BoNT/A, /B, /E, and /F with a single, high affinity monoclonal antibody for detection of botulinum neurotoxin by Endopep-MS. *PLoS One* **5**, e12237.

- Kawamura, S., Saitou, N. & Ueda, S.. (1992).** Concerted evolution of the primate immunoglobulin alpha-gene through gene conversion. *J Biol Chem* **267**, 7359–7367.
- Kirsch, M., Zaman, M., Meier, D., Dübel, S. & Hust, M.. (2005).** Parameters affecting the display of antibodies on phage. *J Immunol Methods* **301**, 173–185.
- Kirsch, M. I., Hülseweh, B., Nacke, C., Rülker, T., Schirrmann, T., Marschall, H.-J., Hust, M. & Dübel, S.. (2008).** Development of human antibody fragments using antibody phage display for the detection and diagnosis of Venezuelan equine encephalitis virus (VEEV). *BMC Biotechnol* **8**, 66.
- Knappik, A., Ge, L., Honegger, A., Pack, P., Fischer, M., Wellnhofer, G., Hoess, A., Wölle, J., Plückthun, A. & Virnekäs, B.. (2000).** Fully synthetic human combinatorial antibody libraries (HuCAL) based on modular consensus frameworks and CDRs randomized with trinucleotides. *J Mol Biol* **296**, 57–86.
- Knechtle, S. J.. (2001).** Treatment with immunotoxin. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **356**, 681–689.
- Köhler, G. & Milstein, C.. (1975).** Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* **256**, 495–497.
- Kreitman, R. J.. (2006).** Immunotoxins for targeted cancer therapy. *AAPS J* **8**, E532–551.
- Kreyden, O. P., Geiges, M. L., Böni, R. & Burg, G.. (2000).** Botulinumtoxin: Vom Gift zum Medikament Ein historischer Rückblick. *Hautarzt* **51**, 733–737.
- Kuepper, M. B., Huhn, M., Spiegel, H., Ma, J. K. C., Barth, S., Fischer, R. & Finnern, R.. (2005).** Generation of human antibody fragments against *Streptococcus mutans* using a phage display chain shuffling approach. *BMC Biotechnol* **5**, 4.
- Kuus-Reichel, K., Grauer, L. S., Karavodin, L. M., Knott, C., Krusemeier, M. & Kay, N. E.. (1994).** Will immunogenicity limit the use, efficacy, and future development of therapeutic monoclonal antibodies? *Clin Diagn Lab Immunol* **1**, 365–372.
- Lacy, D. B., Tepp, W., Cohen, A. C., DasGupta, B. R. & Stevens, R. C.. (1998).** Crystal structure of botulinum neurotoxin type A and implications for toxicity. *Nat Struct Biol* **5**, 898–902.
- Li, D., Mattoo, P. & Keller, J. E.. (2012).** New equine antitoxins to botulinum neurotoxins serotypes A and B. *Biol J Int Assoc Biol Stand* **40**, 240–246.
- Liu, Z., Zhang, C., Li, Y., Song, C., Sun, Y., Wei, Y., Xu, Z., Yang, A., Xu, Z. & other authors. (2012).** High sensitivity ELISA for detection of botulinum neurotoxin serotype F. *Hybrid* **2005** **31**, 233–239.
- LoBuglio, A. F., Wheeler, R. H., Trang, J., Haynes, A., Rogers, K., Harvey, E. B., Sun, L., Ghrayeb, J. & Khazaeli, M. B.. (1989).** Mouse/human chimeric monoclonal antibody in man: kinetics and immune response. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 4220–4224.



- Luo, G. X., Kohlstaedt, L. A., Charles, C. H., Gorfain, E., Morantte, I., Williams, J. H. & Fang, F. (2003). Humanization of an anti-ICAM-1 antibody with over 50-fold affinity and functional improvement. *J Immunol Methods* **275**, 31–40.
- Mansur, H. S., Oréfice, R. L., Vasconcelos, W. L., Lobato, Z. P. & Machado, L. J. C.. (2005). Biomaterial with chemically engineered surface for protein immobilization. *J Mater Sci Mater Med* **16**, 333–340.
- Marks, J. D., Hoogenboom, H. R., Bonnert, T. P., McCafferty, J., Griffiths, A. D. & Winter, G.. (1991). By-passing immunization. Human antibodies from V-gene libraries displayed on phage. *J Mol Biol* **222**, 581–597.
- Matsumoto, S., Yamashita, M., Katakura, Y., Aiba, Y., Tomimatsu, K., Kabayama, S., Teruya, K. & Shirahata, S.. (2008). A rapid and efficient strategy to generate antigen-specific human monoclonal antibody by in vitro immunization and the phage display method. *J Immunol Methods* **332**, 2–9.
- May, M. L. A., Corkeron, M. A. & Stretton, M.. (2010). Infant botulism in Australia: availability of human botulinum antitoxin for treatment. *Med J Aust* **193**.
- Mazuet, C., Dano, J., Popoff, M. R., Créminon, C. & Volland, H.. (2010). Characterization of botulinum neurotoxin type A neutralizing monoclonal antibodies and influence of their half-lives on therapeutic activity. *PLoS One* **5**, e12416.
- McCafferty, J., Griffiths, A. D., Winter, G. & Chiswell, D. J.. (1990). Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature* **348**, 552–554.
- Melton, R. G. & Sherwood, R. F.. (1996). Antibody-enzyme conjugates for cancer therapy. *J Natl Cancer Inst* **88**, 153–165.
- Midura, T. F. & Arnon, S. S.. (1976). Infant botulism. Identification of *Clostridium botulinum* and its toxins in faeces. *Lancet* **2**, 934–936.
- Moghaddam, A., Borgen, T., Stacy, J., Kausmally, L., Simonsen, B., Marvik, O. J., Brekke, O. H. & Braunagel, M.. (2003). Identification of scFv antibody fragments that specifically recognise the heroin metabolite 6-monoacetylmorphine but not morphine. *J Immunol Methods* **280**, 139–155.
- Mollova, S., Retter, I., Hust, M., Dübel, S. & Müller, W.. (2010). Analysis of Single Chain Antibody Sequences Using the VBASE2 Fab Analysis Tool. In *Antib Eng*, pp. 3–10. Edited by R. Kontermann & S. Dübel. Springer Berlin Heidelberg.
- Montecucco, C.. (1986). How do tetanus and botulinum toxins bind to neuronal membranes? *Trends Biochem Sci* **11**, 314–317.

- Moon, S. A., Ki, M. K., Lee, S., Hong, M.-L., Kim, M., Kim, S., Chung, J., Rhee, S. G. & Shim, H.. (2011).** Antibodies against non-immunizing antigens derived from a large immune scFv library. *Mol Cells* **31**, 509–513.
- Morrison, S. L., Johnson, M. J., Herzenberg, L. A. & Oi, V. T.. (1984).** Chimeric human antibody molecules: mouse antigen-binding domains with human constant region domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**, 6851–6855.
- Murphy, K.. (2011).** *Janeway's Immunobiology 8th Edition*.
- Nakamura, M., Oba, Y., Mori, T., Sato, K., Ishida, Y., Matsuda, T. & Nakamura, H.. (2002).** Generation of Polyclonal Antibody against  $\mu$ -Conotoxin GIIIA Using an Immunogen of [Cys5] $\mu$ -Conotoxin GIIIA Site-Specifically Conjugated with Bovine Serum Albumin. *Biochem Biophys Res Commun* **290**, 1037–1041.
- Nelson, P. N., Reynolds, G. M., Waldron, E. E., Ward, E., Giannopoulos, K. & Murray, P. G.. (2000).** Demystified ... Monoclonal antibodies. *Mol Pathol* **53**, 111–117.
- Nielsen, U. B., Adams, G. P., Weiner, L. M. & Marks, J. D.. (2000).** Targeting of bivalent anti-ErbB2 diabody antibody fragments to tumor cells is independent of the intrinsic antibody affinity. *Cancer Res* **60**, 6434–6440.
- Nowakowski, A., Wang, C., Powers, D. B., Amersdorfer, P., Smith, T. J., Montgomery, V. A., Sheridan, R., Blake, R., Smith, L. A. & Marks, J. D.. (2002).** Potent neutralization of botulinum neurotoxin by recombinant oligoclonal antibody. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 11346–11350.
- Omidfar, K., Rasaee, M. J., Modjtahedi, H., Forouzandeh, M., Taghikhani, M. & Golmakani, N.. (2004).** Production of a novel camel single-domain antibody specific for the type III mutant EGFR. *Tumour Biol J Int Soc Oncodevelopmental Biol Med* **25**, 296–305.
- Parmley, S. F. & Smith, G. P.. (1988).** Antibody-selectable filamentous fd phage vectors: affinity purification of target genes. *Gene* **73**, 305–318.
- Pathan, N. I., Zou, A., Chu, P., Wynne, D., Leigh, B. & Hanna, N.. (2004).** Lumiliximab (IDEC-152), an anti-CD23 antibody, induces apoptosis in vitro and in vivo in CLL cells. *AACR Meet Abstr* **2004**, 163.
- Peck, M. W.. (2009).** Biology and genomic analysis of *Clostridium botulinum*. *Adv Microb Physiol* **55**, 183–265, 320.
- Pelat, T. & Thullier, P.. (2009).** Non-human primate immune libraries combined with germline humanization: an (almost) new, and powerful approach for the isolation of therapeutic antibodies. *mAbs* **1**, 377–381.

- Pelat, T., Hust, M., Laffly, E., Condemine, F., Bottex, C., Vidal, D., Lefranc, M.-P., Dübel, S. & Thullier, P. (2007).** High-affinity, human antibody-like antibody fragment (single-chain variable fragment) neutralizing the lethal factor (LF) of *Bacillus anthracis* by inhibiting protective antigen-LF complex formation. *Antimicrob Agents Chemother* **51**, 2758–2764.
- Pelat, T., Bedouelle, H., Rees, A. R., Crennell, S. J., Lefranc, M.-P. & Thullier, P. (2008).** Germline humanization of a non-human primate antibody that neutralizes the anthrax toxin, by in vitro and in silico engineering. *J Mol Biol* **384**, 1400–1407.
- Pelat, T., Hust, M., Hale, M., Lefranc, M.-P., Dübel, S. & Thullier, P. (2009).** Isolation of a human-like antibody fragment (scFv) that neutralizes ricin biological activity. *BMC Biotechnol* **9**, 60.
- Pellett, S. (2012).** Learning from the past: historical aspects of bacterial toxins as pharmaceuticals. *Curr Opin Microbiol* **15**, 292–299.
- Pini, A., Viti, F., Santucci, A., Carnemolla, B., Zardi, L., Neri, P. & Neri, D. (1998).** Design and use of a phage display library. Human antibodies with subnanomolar affinity against a marker of angiogenesis eluted from a two-dimensional gel. *J Biol Chem* **273**, 21769–21776.
- Pommié, C., Levadoux, S., Sabatier, R., Lefranc, G. & Lefranc, M.-P. (2004).** IMGT standardized criteria for statistical analysis of immunoglobulin V-REGION amino acid properties. *J Mol Recognit JMR* **17**, 17–32.
- Popoff, M. R. & Bouvet, P. (2013).** Genetic characteristics of toxigenic *Clostridia* and toxin gene evolution. *Toxicon Off J Int Soc Toxinology* **75**, 63–89.
- Porter, R. R. (1991).** Structural Studies of Immunoglobulins. *Scand J Immunol* **34**, 382–388.
- Powers, D. B., Amersdorfer, P., Poul, M., Nielsen, U. B., Shalaby, M. R., Adams, G. P., Weiner, L. M. & Marks, J. D. (2001).** Expression of single-chain Fv-Fc fusions in *Pichia pastoris*. *J Immunol Methods* **251**, 123–135.
- Rakonjac, J., Bennett, N. J., Spagnuolo, J., Gagic, D. & Russel, M. (2011).** Filamentous bacteriophage: biology, phage display and nanotechnology applications. *Curr Issues Mol Biol* **13**, 51–76.
- Rasetti-Escargueil, C., Jones, R. G. A., Liu, Y. & Sesardic, D. (2009).** Measurement of botulinum types A, B and E neurotoxicity using the phrenic nerve-hemidiaphragm: improved precision with in-bred mice. *Toxicon Off J Int Soc Toxinology* **53**, 503–511.
- Rasetti-Escargueil, C., Liu, Y., Rigsby, P., Jones, R. G. A. & Sesardic, D. (2011).** Phrenic nerve-hemidiaphragm as a highly sensitive replacement assay for determination of functional botulinum toxin antibodies. *Toxicon Off J Int Soc Toxinology* **57**, 1008–1016.
- Ravetch, J. V. & Bolland, S. (2001).** IgG Fc receptors. *Annu Rev Immunol* **19**, 275–290.

- Reche, P. A., Fernandez-Caldas, E., Flower, D. R., Fridkis-Hareli, M. & Hoshino, Y.. (2014).** Peptide-based immunotherapeutics and vaccines. *J Immunol Res* **2014**, 256784.
- Retter, I., Althaus, H. H., Münch, R. & Müller, W.. (2005).** VBASE2, an integrative V gene database. *Nucleic Acids Res* **33**, D671–674.
- Riechmann, L., Clark, M., Waldmann, H. & Winter, G.. (1988).** Reshaping human antibodies for therapy. *Nature* **332**, 323–327.
- Ritter, M. A.. (2000).** Polyclonal and monoclonal antibodies. *Methods Mol Med* **40**, 23–34.
- Rondot, S., Koch, J., Breitling, F. & Dübel, S.. (2001).** A helper phage to improve single-chain antibody presentation in phage display. *Nat Biotechnol* **19**, 75–78.
- Rosenwasser, L. J., Busse, W. W., Lizambri, R. G., Olejnik, T. A. & Totoritis, M. C.. (2003).** Allergic asthma and an anti-CD23 mAb (IDEC-152): results of a phase I, single-dose, dose-escalating clinical trial. *J Allergy Clin Immunol* **112**, 563–570.
- Rülker, T., Voß, L., Thullier, P., O' Brien, L. M., Pelat, T., Perkins, S. D., Langermann, C., Schirrmann, T., Dübel, S. & other authors. (2012).** Isolation and characterisation of a human-like antibody fragment (scFv) that inactivates VEEV in vitro and in vivo. *PLoS One* **7**, e37242.
- Saggy, I., Wine, Y., Shefet-Carasso, L., Nahary, L., Georgiou, G. & Benhar, I.. (2012).** Antibody isolation from immunized animals: comparison of phage display and antibody discovery via V gene repertoire mining. *Protein Eng Des Sel PEDS* **25**, 539–549.
- Sakaguchi, G.. (1982).** Clostridium botulinum toxins. *Pharmacol Ther* **19**, 165–194.
- Schellekens, H.. (2002).** Immunogenicity of therapeutic proteins: clinical implications and future prospects. *Clin Ther* **24**, 1720–1740; discussion 1719.
- Schirrmann, T., Meyer, T., Schütte, M., Frenzel, A. & Hust, M.. (2011).** Phage display for the generation of antibodies for proteome research, diagnostics and therapy. *Mol Basel Switz* **16**, 412–426.
- Schroff, R. W., Foon, K. A., Beatty, S. M., Oldham, R. K. & Morgan, A. C., Jr. (1985).** Human anti-murine immunoglobulin responses in patients receiving monoclonal antibody therapy. *Cancer Res* **45**, 879–885.
- Schütte, M., Thullier, P., Pelat, T., Wezler, X., Rosenstock, P., Hinz, D., Kirsch, M. I., Hasenberg, M., Frank, R. & other authors. (2009).** Identification of a putative Crf splice variant and generation of recombinant antibodies for the specific detection of *Aspergillus fumigatus*. *PLoS One* **4**, e6625.
- Schwimmer, L. J., Huang, B., Giang, H., Cotter, R. L., Chemla-Vogel, D. S., Dy, F. V., Tam, E. M., Zhang, F., Toy, P. & other authors. (2013).** Discovery of diverse and functional antibodies from large human repertoire antibody libraries. *J Immunol Methods* **391**, 60–71.

- Sela-Culang, I., Kunik, V. & Ofran, Y.. (2013).** The Structural Basis of Antibody-Antigen Recognition. *Front Immunol* **4**, 302.
- Shapiro, R. L., Hatheway, C. & Swerdlow, D. L.. (1998).** Botulism in the United States: a clinical and epidemiologic review. *Ann Intern Med* **129**, 221–228.
- Shawler, D. L., Bartholomew, R. M., Smith, L. M. & Dillman, R. O.. (1985).** Human immune response to multiple injections of murine monoclonal IgG. *J Immunol Baltim Md 1950* **135**, 1530–1535.
- Sheets, M. D., Amersdorfer, P., Finnern, R., Sargent, P., Lindquist, E., Schier, R., Hemingsen, G., Wong, C., Gerhart, J. C. & other authors. (1998).** Efficient construction of a large nonimmune phage antibody library: the production of high-affinity human single-chain antibodies to protein antigens. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 6157–6162.
- Sheridan, R. E., Deshpande, S. S., Amersdorfer, P., Marks, J. D. & Smith, T.. (2001).** Anomalous enhancement of botulinum toxin type A neurotoxicity in the presence of antitoxin. *Toxicon Off J Int Soc Toxinology* **39**, 651–657.
- Simpson, L. L.. (1980).** Kinetic studies on the interaction between botulinum toxin type A and the cholinergic neuromuscular junction. *J Pharmacol Exp Ther* **212**, 16–21.
- Smith, G. P.. (1985).** Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* **228**, 1315–1317.
- Smith, L. A.. (2009).** Botulism and vaccines for its prevention. *Vaccine* **27 Suppl 4**, D33–39.
- Smith, L. A. & Rusnak, J. M.. (2007).** Botulinum neurotoxin vaccines: past, present, and future. *Crit Rev Immunol* **27**, 303–318.
- Smith, T. J., Lou, J., Geren, I. N., Forsyth, C. M., Tsai, R., Laporte, S. L., Tepp, W. H., Bradshaw, M., Johnson, E. A. & other authors. (2005).** Sequence variation within botulinum neurotoxin serotypes impacts antibody binding and neutralization. *Infect Immun* **73**, 5450–5457.
- Sobel, J.. (2005).** Botulism. *Clin Infect Dis* **41**, 1167–1173.
- Specthrie, L., Bullitt, E., Horiuchi, K., Model, P., Russel, M. & Makowski, L.. (1992).** Construction of a microphage variant of filamentous bacteriophage. *J Mol Biol* **228**, 720–724.
- Steinberger, P., Sutton, J. K., Rader, C., Elia, M. & Barbas, C. F., 3rd. (2000).** Generation and characterization of a recombinant human CCR5-specific antibody. A phage display approach for rabbit antibody humanization. *J Biol Chem* **275**, 36073–36078.
- Steinwand, M., Droste, P., Frenzel, A., Hust, M., Dübel, S. & Schirrmann, T.. (2014).** The influence of antibody fragment format on phage display based affinity maturation of IgG. *mAbs* **6**, 204–218.

- Stockwin, L. & Holmes, S.. (2003).** Antibodies as therapeutic agents: vive la renaissance! *Expert Opin Biol Ther* **3**, 1133–1152.
- Tan, P., Mitchell, D. A., Buss, T. N., Holmes, M. A., Anasetti, C. & Foote, J.. (2002).** ‘Superhumanized’ antibodies: reduction of immunogenic potential by complementarity-determining region grafting with human germline sequences: application to an anti-CD28. *J Immunol Baltim Md 1950* **169**, 1119–1125.
- Thie, H., Voedisch, B., Dübel, S., Hust, M. & Schirrmann, T.. (2009).** Affinity maturation by phage display. *Methods Mol Biol Clifton NJ* **525**, 309–322, xv.
- Thie, H., Toleikis, L., Li, J., von Wasielewski, R., Bastert, G., Schirrmann, T., Esteves, I. T., Behrens, C. K., Fournes, B. & other authors. (2011).** Rise and fall of an anti-MUC1 specific antibody. *PloS One* **6**, e15921.
- Thullier, P., Huish, O., Pelat, T. & Martin, A. C. R.. (2010).** The humanness of macaque antibody sequences. *J Mol Biol* **396**, 1439–1450.
- Tucker, J. B.. (2000).** *Toxic Terror: Assessing the Terrorist Use of Chemical and Biological Weapons*. MIT Press.
- Vieira, J. & Messing, J.. (1987).** Production of single-stranded plasmid DNA. *Methods Enzymol* **153**, 3–11.
- Whitelegg, N. R. & Rees, A. R.. (2000).** WAM: an improved algorithm for modelling antibodies on the WEB. *Protein Eng* **13**, 819–824.
- Wild, M. A., Xin, H., Maruyama, T., Nolan, M. J., Calveley, P. M., Malone, J. D., Wallace, M. R. & Bowdish, K. S.. (2003).** Human antibodies from immunized donors are protective against anthrax toxin in vivo. *Nat Biotechnol* **21**, 1305–1306.
- Yang, J. & Rader, C.. (2012).** Cloning, expression, and purification of monoclonal antibodies in scFv-Fc format. *Methods Mol Biol Clifton NJ* **901**, 209–232.
- Zdanovsky, A., Zdanovsky, D. & Zdanovskaia, M.. (2012).** Epitope mapping of botulinum neurotoxins light chains. *Toxicon Off J Int Soc Toxinology* **60**, 1277–1286.
- Zhao, L., Ning, B., Bai, J., Chen, X., Peng, Y., Sun, S., Li, G., Fan, X., Liu, Y. & other authors. (2013).** Selection of bisphenol A - single-chain antibodies from a non-immunized mouse library by ribosome display. *Anal Biochem*.

## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Stefan Dübel, der mir die Möglichkeit der Promotion in seiner Arbeitsgruppe eröffnete sowie für die Übernahme des Promotionsvorsitzes.

Besonders möchte ich mich bei meinem Mentor, Herrn Prof. Dr. Michael Hust, für das freundschaftliche Verhältnis und die stetige Unterstützung bedanken. Seine anregenden Ideen und die fortwährende Motivation trugen maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit bei.

Mein Dank gilt ebenfalls Herrn Prof. Dr. Dieter Jahn für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Des Weiteren gilt mein Dank all den Kooperationspartnern von AntiBotABE, die mich über die Jahre begleitet haben, für die ausgezeichnete Zusammenarbeit und angenehme Arbeitsatmosphäre. Besonders möchte ich mich für den zuvorkommenden Empfang und die freundliche Atmosphäre während meines Aufenthalts in CRSSA und NIBSC bedanken.

Für die Durchführung des *in vivo* Maus Letalitäts Assays möchte ich mich bei Michel Popoff und Christelle Mazuet vom *Institut Pasteur* bedanken.

Dr. André Frenzel und Dr. Thomas Schirrmann danke ich besonders für ihre stetige fachliche Anregung und Diskussionsbereitschaft. Zudem gilt mein Dank der gesamten Arbeitsgruppe der Abteilung für Biotechnologie für die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Mein größter Dank gilt meiner Familie und all den Freunden, die mich stets unterstützt und motiviert haben.





*Pro salute omnium.*